



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CAMPUS PROFESSORA CINOBELINA ELVAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA TROPICAL – PPGZT**

NEURIMAR ARAÚJO DA SILVA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE PROTEASES EXTRAÍDAS DA
CASCA DO FRUTO DA CASTANHA-DO-GURGUEIA (*DIPTERYX
LACUNIFERA* DUCKE) E SUA APLICAÇÃO EM RAÇÕES PARA
FRANGOS DE CORTE**

Bom Jesus-PI
2025

NEURIMAR ARAÚJO DA SILVA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE PROTEASES EXTRAÍDAS DA
CASCA DO FRUTO DA CASTANHA-DO-GURGUEIA (*DIPTERYX*
LACUNIFERA DUCKE) E SUA APLICAÇÃO EM RAÇÕES PARA
FRANGOS DE CORTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Tropical (PPGZT) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), como requisito parcial para a obtenção do título de doutor. Área de concentração: Produção Animal nos Trópicos Linha de pesquisa: Produção de Alimentos e Nutrição Animal nos Trópicos.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento

Coorientador: Prof. Dr. Mauricio de Paula Ferreira Teixeira

Bom Jesus-PI
2025

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Campus Professora Cinobelina Elvas
Setor de Processamento Técnico

S586p Silva, Neurimar Araújo da.

Potencial biotecnológico de proteases extraídas da casca do fruto da castanha do gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke) e sua aplicação em rações para frangos de corte / Neurimar Araújo da Silva. -- 2025.
86 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Tropical, Bom Jesus, Piauí, 2025.

“Orientador: Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento”.

“Coorientador: Prof. Dr. Maurício de Paula Ferreira Teixeira”.

1. Zootecnia. 2. Nutrição animal. 3. Aditivo enzimático.

I. Nascimento, Thiago Pajeú. II. Teixeira, Maurício de Paula Ferreira.
III. Título.

CDD 636

Bibliotecária: Nayra Fontinele Feijão – CRB3/1249

NEURIMAR ARAÚJO DA SIVA

**POTENCIAL BIOTECNOLOGICO DE PROTEASES EXTRAIDAS DA
CASCA DO FRUTO DA CASTANHA-DO-GURGUEIA (*DIPTERYX
LACUNIFERA* DUCKE) E SUA APLICAÇÃO EM RAÇÕES PARA
FRANGOS DE CORTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Tropical (PPGZT) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), como requisito parcial para a obtenção do título de doutor. Área de concentração: Produção Animal nos Trópicos Linha de pesquisa: Produção de Alimentos e Nutrição Animal nos Trópicos.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento

Coorientador: Prof. Dr. Mauricio de Paula Ferreira Teixeira

Aprovado, 31 de Janeiro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **THIAGO PAJEU NASCIMENTO**
Data: 27/03/2026 14:52:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento (UFPI)
Orientador

Documento assinado digitalmente
 **LEILANE ROCHA BARROS DOURADO**
Data: 27/03/2026 14:45:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Leilane Rocha Barros Dourado (UFPI)
Examinadora interna

Documento assinado digitalmente
 **ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDAO COSTA**
Data: 25/03/2026 11:36:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa (UPE)
Examinadora interna

Documento assinado digitalmente
 **JUANIZE MATIAS DA SILVA BATISTA**
Data: 26/03/2026 09:04:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Juanize Matias da Silva Batista (UFRPE)
Examinadora externa

Documento assinado digitalmente
 **FRANCINETE ALVES DE SOUSA MOURA**
Data: 27/03/2026 14:32:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Francinete Alves de Sousa Moura (UESPI)
Examinadora externa

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, em especial ao meu esposo Natã, meu filho Yuri Miguel, aos meus pais Socorro e Valdemar pela força em todos os momentos. Ao meu Orientador, Thiago Pajeú Nascimento por todo compromisso e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao **Senhor Jesus e a Nossa Senhora** por serem minha rocha de sustentação em muitos momentos árdusos;

A **minha família** (Natã, Yuri Miguel, Socorro, Valdemar e todos meus irmãos) por sempre acreditarem e torcerem para minha evolução profissional;

A **Universidade Federal do Piauí** pela oportunidade de cursar o Doutorado, bem como agradecer também a **Capes** pela concessão da bolsa para a realização dos estudos;

Ao meu **Orientador Thiago Pajeú Nascimento** por ter aceitado essa missão de me orientar entre meios entraves. Você sempre será minha inspiração de futuro profissional e dedicação, obrigada pelos auxílios e conselhos;

Ao meu Co-orientador **Mauricio de Paula Teixeira** pela dedicação e compromisso durante toda essa jornada e as oportunidades a mim concedida;

A minha segunda família **Bioagrofarm**, pela força, união e colaboração em todas as atividades;

Aos meus amigos que a Bioagrofarm me deu **Tiago de Oliveira, Ozires Guimarães, Glayce Kelly, Vanusa Castro**. Obrigada pela força e auxílio nas atividades laboratoriais;

Enfim, término mais uma etapa de minha vida acadêmica com o coração cheio de gratidão.

EPÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

RESUMO

A castanheira-de-gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke), popularmente conhecida como "castanheira de burro" ou "fava de morcego", é uma espécie nativa da região Nordeste do Brasil, reconhecida principalmente pelas suas amêndoas, que contêm elevados níveis de lipídios e proteínas. Contudo, o potencial biotecnológico de seus resíduos, como a casca dos frutos, ainda é pouco explorado. A casca da castanheira pode ser uma fonte promissora para a extração de enzimas, como as proteases, que podem ter aplicações no setor agropecuário, especialmente na alimentação animal. A avicultura de corte, uma importante atividade econômica para o Brasil, enfrenta desafios relacionados ao estresse térmico, que prejudica o bem-estar das aves e afeta seu desempenho produtivo. Como os frangos são animais homeotérmicos, têm dificuldades em regular sua temperatura corporal em condições de calor extremo, o que pode resultar em impactos negativos na produtividade. Portanto, explorar alternativas nutricionais que ajudem a mitigar os efeitos do estresse térmico é uma área de grande interesse para a avicultura. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico de proteases extraídas da casca do fruto da castanheira-do-gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke) e sua aplicação em rações para frangos de corte. Além disso, buscou-se verificar os efeitos da adição de extrato bruto e purificado dessas proteases na dieta de pintos de corte durante a fase de 1 a 7 dias de idade, sob condições de estresse térmico. O extrato bruto de proteases foi obtido através da maceração da casca dos frutos de *D. lacunifera*, seguido de extração com tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 8, agitação por 120 minutos e centrifugação. A atividade das proteases e a quantificação proteica foi avaliada, assim como a caracterização bioquímica da enzima que incluiu a determinação do pH ótimo, temperatura ótima e suas estabilidade, assim como a influência de íons e surfactantes sobre a atividade enzimática da protease. Foi feita ainda a avaliação da toxicidade do extrato frente a *Artemia salina* e a estabilidade da enzima sobre rações comerciais para frangos de corte. A purificação das enzimas foi realizada utilizando o sistema de duas fases aquosas (PEG/Sal) através de um planejamento fatorial 2⁴. Para a avaliação da aplicação da enzima para análise *in vivo*, 150 pintos da linhagem Cobb foram distribuídos em um experimento totalmente casualizado, com três tratamentos: grupo controle (sem enzima), grupo com enzima extraída do extrato bruto (300 unidades/g de ração) e grupo com enzima purificada (6,6 g/kg de ração). Os pintos foram expostos a condições de estresse térmico durante a fase de 1 a 7 dias de idade. As proteases extraídas apresentaram uma atividade de 30,66 U/mL e uma atividade específica de 66,65 U/mg. A caracterização bioquímica revelou um pH ótimo de 11, parcialmente estável após 24 horas e uma temperatura ótima de 50°C, com estabilidade por até 90 minutos. A adição de Mg²⁺ aumentou a atividade enzimática em 11%, enquanto os demais íons reduziram a atividade. O extrato mostrou-se estável em rações peletizadas e fareladas e não apresentou toxicidade para *Artemia salina*. A purificação utilizando o sistema de duas fases aquosas resultou em uma recuperação de 204,22% da atividade enzimática, com um fator de purificação de 8,6. Quanto ao desempenho das aves, os resultados mostraram que, após 7 dias de estresse térmico, os pintos que receberam o extrato purificado apresentaram ganho de peso significativamente maior em comparação aos grupos controle e com extrato bruto. As proteases extraídas da casca do fruto da *Dipteryx lacunifera* Ducke demonstraram características bioquímicas favoráveis, elevada estabilidade em rações e ausência de toxicidade, indicando seu potencial como aditivo enzimático sustentável na nutrição animal. Além disso, a suplementação com esse extrato purificado melhorou significativamente o ganho de peso dos frangos de corte, mesmo sob condições severas de estresse térmico, destacando o valor dessa alternativa na avicultura. Este estudo sugere que a utilização dessas proteases pode ser uma estratégia promissora para melhorar os parâmetros produtivos dos frangos, como ganho de peso e conversão alimentar, especialmente quando combinada com medidas ambientais adequadas para reduzir os efeitos do estresse térmico.

Palavras-chave: aditivo enzimático, nutrição animal, enzimas proteolíticas, fava do morcego.

ABSTRACT

The castanheira-de-gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke), popularly known as "castanheira de burro" or "fava de morcego," is a species native to the Northeast region of Brazil, primarily recognized for its almonds, which contain high levels of lipids and proteins. However, the biotechnological potential of its residues, such as the fruit peel, remains largely unexplored. The peel of the castanheira may be a promising source for the extraction of enzymes, such as proteases, which can have applications in the agricultural sector, particularly in animal feed. Broiler poultry farming, an important economic activity in Brazil, faces challenges related to thermal stress, which harms the well-being of the birds and affects their productive performance. Since chickens are homeothermic animals, they have difficulty regulating their body temperature in extreme heat conditions, which can result in negative impacts on productivity. Therefore, exploring nutritional alternatives to help mitigate the effects of thermal stress is an area of great interest for poultry farming. This study aimed to evaluate the biotechnological potential of proteases extracted from the fruit peel of castanheira-de-gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke) and their application in broiler poultry feed. Additionally, the study sought to assess the effects of adding both crude and purified extracts of these proteases to the diet of day-old chicks (1-7 days of age) under thermal stress conditions. The crude protease extract was obtained by macerating the fruit peel of *D. lacunifera*, followed by extraction with 0.1 M sodium phosphate buffer at pH 8, agitation for 120 minutes, and centrifugation. The protease activity and protein quantification were evaluated, as well as the biochemical characterization of the enzyme, which included determining the optimal pH, optimal temperature, and enzyme stability, along with the influence of ions and surfactants on enzyme activity. The toxicity of the extract was assessed using *Artemia salina*, and the enzyme stability in commercial broiler feed was also evaluated. Enzyme purification was carried out using a two-phase aqueous system (PEG/Sal) through a 2⁴ factorial design. For the in vivo application assessment, 150 Cobb chicks were distributed in a completely randomized experiment with three treatments: a control group (without enzyme), a group with enzyme extracted from the crude extract (300 units/g of feed), and a group with purified enzyme (6.6 g/kg of feed). The chicks were exposed to thermal stress conditions during the first 7 days of age. The extracted proteases presented an activity of 30.66 U/mL and a specific activity of 66.65 U/mg. The biochemical characterization revealed an optimal pH of 11, which was partially stable after 24 hours, and an optimal temperature of 50°C, with stability for up to 90 minutes. The addition of Mg²⁺ increased enzyme activity by 11%, while other ions reduced the activity. The extract was stable in pelleted and crumbled feed and showed no toxicity to *Artemia salina*. The purification using the two-phase aqueous system resulted in a recovery of 204.22% of enzyme activity, with a purification factor of 8.6. Regarding bird performance, the results showed that after 7 days of thermal stress, the chicks that received the purified extract had a significantly higher weight gain compared to the control and crude extract groups. Proteases extracted from the fruit peel of *Dipteryx lacunifera* Ducke demonstrated favorable biochemical characteristics, high stability in feed, and no toxicity, indicating their potential as a sustainable enzymatic additive in animal nutrition. Moreover, supplementation with this purified extract significantly improved the weight gain of broiler chickens, even under severe thermal stress conditions, highlighting the value of this alternative in poultry farming. This study suggests that the use of these proteases can be a promising strategy to improve productive parameters in broilers, such as weight gain and feed conversion, especially when combined with appropriate environmental measures to reduce the effects of thermal stress.

Keywords: Enzymatic additive, animal nutrition, proteolytic enzymes, bat fruit.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Árvore da Castanheira do Gurguéia (<i>Dipteryx lacunifera</i> Ducke).	18
Figura 2 - Fruto da Castanheira do Gurguéia (<i>Dipteryx lacunifera</i> Ducke).	19
Figura 3 - A - Parte interna do fruto da Castanheira do Gurguéia (<i>Dipteryx lacunifera</i> Ducke) e B – Castanha da <i>D.lacunifera</i> Ducke.	20
Figura 4 - pH das diferentes porções do sistema digestivo da ave com respectiva protease adequada.	27
Figura 5 - Efeitos combinados da temperatura ambiente e da umidade relativa para definir o nível do estresse por calor.	30

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Casca do fruto da castanha-do-gurguéia (<i>Dipteryx lacunifera</i> Ducke) obtida pela separação da casca da castanha..	47
Figura 2 - Atividade residual de proteases extraídas da casca do fruto da castanheira-do-gurguéia (<i>Dipteryx lacunifera</i> Ducke) frente a diferentes temperaturas.	54
Figura 3 - Efeito do tempo na estabilidade da protease extraída da casca do fruto da castanha-do-Gurguéia a 50°C.	55
Figura 4 - Efeito do pH na estabilidade da protease extraídas da casca do fruto da <i>D. lacunifera</i> Ducke.	56
Figura 5 - Efeito do tempo na estabilidade da protease extraída da casca do fruto da <i>D. lacunifera</i> Ducke em pH 11,0.	57
Figura 6 - Efeitos das variáveis independentes (MMPEG, CPEG, pH, CSal) na recuperação da enzima no SAL (Y sal)	62
Figura 7 - Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^4 , tendo como variável-resposta a recuperação das proteases para a fase sal (Y sal) para analisar a concentração do PEG em função da massa molar do PEG.	62
Figura 8 - Efeito das variáveis sobre o fator de purificação (FP_{SAL}) da protease extraída da casca do fruto da castanheira do-Gurguéia pelo sistema de duas fases aquosas na fase rica em sal. (FP_{SAL}).	63

CAPÍTULO 3

Figura 1 – Galpão convencional localizado no Colégio Técnico de Bom Jesus, UFPI	71
Figura 2 – Pintos de corte alojados nas gaiolas.....	72
Figura 3. Imagens termográficas da avaliação da temperatura da superfície de pintinhos de 7 dias de idade estressados por calor.....	75
Figura 4. Variação da temperatura, umidade e índice de temperatura e umidade (ITU) ao longo do período experimental.....	77

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Temperatura ambiente para o conforto térmico na criação de frangos de corte...29

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Níveis das variáveis estudadas no planejamento fatorial completo 2 ⁴ para purificação da protease extraída da casca da Castanheira do Gurguéia (<i>Dipteryx lacunifera</i> Ducke)	50
Tabela 2 -Atividade de proteases extraídas da casca do fruto da Castanheira-do-Gurguéia (<i>Dipteryx lacunifera</i> Ducke) utilizando diferentes tampões e tempos de extração.....	51
Tabela 3 – Avaliação da atividade ótima das proteases extraídas da casca do fruto da castanheira-do-Gurguéia (<i>Dipteryx lacunifera</i> Ducke)	53
Tabela 4 - Caracterização da atividade de proteases extraídas da casca do fruto da castanheira-do-Gurguéia (<i>Dipteryx lacunifera</i> Ducke) frente a diferentes tempos.....	54
Tabela 5 - Efeito dos íons e surfactantes na atividade da protease extraída da casca do fruto da <i>D. lacunifera</i> Ducke.....	57
Tabela 6 - Resultados da purificação da protease extraída do fruto da Castanheira do Gurguéia pelo SDFA (PEG/fosfato de sódio).....	60

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Composição percentual e valores nutricionais calculados das rações utilizadas nos experimentos.....	72
Tabela 2. Dados climáticos durante a condução experimental.....	76
Tabela 3 - Parâmetros fisiológicos de frangos de corte de 1 a 7 dias sob estresse térmico por calor.....	77
Tabela 4 - Desempenho de frangos de corte de 1 a 7 dias suplementados com Extrato Bruto e Purificado da Castanheira do Gurgueia.....	79

LISTA DE SÍMBOLOS

PEG = Polietilenoglicol

MM_{PEG} = Massa molar do PEG

C_{sal} = Concentração de fosfato

Y_{SAL} = Recuperação da enzima na fase sal

C = Pontos centrais

C_{PEG} = Concentração do PEG

K = Coeficiente de partição

FP_{PEG} = Fator de purificação na fase PEG

pH = Potencial hidrogeniônico

Y_{PEG} = Recuperação da enzima na fase PEG

FP_{SAL} = Fator de purificação na fase Sal

EBCG= Extrato bruto da castanheira do Gurguéia

EPCG= Extrato Purificado castanheira do Gurguéia

GP = Ganho de peso

CR = Consumo de ração

CA = Conversão alimentar

VIAB = Viabilidade

LOC = Dificuldade de locomoção

CV = Coeficiente de variação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO	17
1.2 Dipteryx Lacunifera Ducke	18
1.3 Resíduos agroindustriais.....	20
1.4 Proteases: funções, importância e aplicações	23
1.5 Aplicação das proteases na nutrição animal	25
1.6 Ação das proteases na fisiologias digestiva das aves	26
1.7 Influência do estresse por calor em frangos de corte.....	28
REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO 2 - USO DA CASCA DO FRUTO DA CASTANHEIRA DO GURGUÉIA (<i>Dipteryx lacunifera</i> DUCKE) COMO FONTE DE PROTEASES: EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE E ESTABILIDADE <i>IN VITRO</i> EM RAÇÕES PARA FRANGOS DE CORTE.....	42
RESUMO.....	44
ABSTRACT	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1 Obtenção do material vegetal e preparo das soluções de extratos	46
2.2 Preparação do extrato bruto contendo as proteases	47
2.3 Determinação da atividade proteásica	48
2.4 Quantificação de proteína.....	48
2.5 Caracterização bioquímica das proteases presentes no extrato bruto.....	48
2.5.1 Efeito da temperatura na atividade e sua estabilidade.....	48
2.5.2 Efeito do pH sobre a atividade e sua estabilidade	48
2.5.3 Efeito de íons metálicos, inibidores e surfactantes.....	49
2.6 Ensaio de toxicidade frente aos náuplios de <i>Artemia salina</i>	49
2.7 Avaliação da atividade proteásica frente a diferentes tipos de rações utilizadas para frangos de corte	50
2.8 Pré-Purificação através do sistema de duas fases aquosas (PEG-Sal)	50
2.9 Análise estatística	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.1 Extração das proteases.....	51
3.2 Caracterização bioquímica das proteases presentes no extrato bruto.....	52
3.3 Avaliação da toxicidade das proteases presentes no extrato bruto frente aos náuplios de <i>Artemia salina</i>	58

3.4 Avaliação da atividade proteásica frente a diferentes tipos de rações utilizadas para frangos de corte	58
3.5 Purificação das proteases presentes no extrato bruto pelo Sistema de Duas Fases Aquosas (PEG/Fosfato de sódio).....	58
4. CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS	65
CAPÍTULO 3 – APLICAÇÃO DE PROTEASES BRUTAS E PURIFICADAS OBTIDAS DA CASCA DO FRUTO DA <i>DIPTERYX LACUNIFERA</i> DUCKE COMO ADITIVO EM DIETA PARA PINTOS DE CORTE EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE TÉRMICO	68
RESUMO.....	69
ABSTRACT	70
1. INTRODUÇÃO	70
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	71
2.1 Local do experimento	71
2.2 Animais e formulação das rações	71
2.3 Monitoramento das condições experimentais e delineamento experimental	74
2.4 Análise estatística	76
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
4. CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS	85

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado do Norte e Nordeste do Brasil abriga uma grande diversidade de espécies frutíferas nativas com potencial exploratório de uso por meio do extrativismo, como é o caso da Castanheira-do-Gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke), suas amêndoas são facilmente encontradas na região Sul e Centro-sul dos estados do Piauí e Maranhão. Estudos sobre essa espécie ainda são escassos, sobretudo a respeito do seu potencial biotecnológico. A castanha dessa espécie de planta é comercializada em feiras livres, possui um elevado teor de lipídios e moderado teor de proteínas, ao qual a torna importante para o consumo humano e como também como fonte de alimentos para os animais da região no período de estiagem (Carvalho *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2012; Polmann *et al.*, 2021). Entretanto, a casca do fruto, que pode representar cerca de 60% do total, permanece subaproveitada, e seu potencial econômico e biotecnológico ainda é pouco explorado, sendo geralmente descartada como resíduo ou tratada como coproduto.

Com a reutilização da matéria prima presente na região e no intuito de reduzir a quantidade de resíduos que muitas vezes é desperdiçado faz-se a necessidade de reciclagem desse material de forma sustentável minimizando a ação de problemas ambientais (Panesar *et al.*, 2016). Os resíduos agroindustriais são subprodutos originados do processamento industrial, de atividades agrícolas ou da produção animal. Muitas vezes, esses materiais são descartados devido à falta de reaproveitamento ou à ausência de valor econômico agregado. No entanto, diversas pesquisas e instituições têm buscado alternativas para minimizar os impactos ambientais e o desperdício causado pelas indústrias dos setores agrícolas, promovendo o reaproveitamento desses materiais (Dou *et al.*, 2018; Shurson, 2020; Pinotti *et al.*, 2023).

Uma das alternativas para o aproveitamento de resíduos é sua utilização como fonte de biomoléculas, passíveis de exploração em diversos setores industriais, como o farmacêutico, alimentício e de produção animal. Dentre essas biomoléculas, destacam-se as proteases, também conhecidas como proteinases ou enzimas proteolíticas. Essas enzimas atuam na hidrólise de ligações peptídicas das proteínas, resultando na formação de fragmentos de peptídeos e aminoácidos (Hadjidj *et al.*, 2018; Elhamdi *et al.*, 2023). As proteases representam a principal categoria de enzimas industriais, respondendo por aproximadamente 65% da produção global de enzimas (Elhamdi *et al.*, 2023). Elas estão amplamente distribuídas entre diferentes formas de vida, sendo produzidas por animais, vegetais e microrganismos (Nascimento *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2019; Neumann *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2020). Devido

à sua participação em inúmeros processos biológicos, essas enzimas possuem aplicações significativas em múltiplos setores industriais.

Entretanto, além da extração para que haja maior eficácia da enzima é necessário também processos de purificação, sobretudo que sejam realizados de forma eficiente, ambientalmente sustentável e de baixo custo (Nascimento *et al.*, 2016; Zydney, 2016). Um dos métodos que vem sendo bastante utilizado para que haja eficiência durante a purificação é o sistema de duas fases aquosas (SDFA), tradicionalmente, esse método de extração é formado por dois polímeros e água, ou por um polímero, um sal inorgânico e água (Souza *et al.*, 2020). Nos últimos anos, os SDFA têm sido o foco das atenções por serem ecologicamente corretos e de baixo custo (Martínez *et al.*, 2023). Amplamente utilizado no campo da biotecnologia, esse método oferece ainda uma alta eficiência na separação e purificação de materiais biológicos, incluindo proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, vírus, anticorpos e organelas celulares (Nascimento *et al.*, 2023).

Além da purificação, outro fator determinante para aumentar a eficácia do processo de catálise enzimática é a influência por fatores como a natureza do meio, substrato, concentração da enzima, temperatura, pH e presença de ativadores e inibidores. As enzimas são catalisadoras altamente eficazes promovendo acelerações significativas nas taxas de reação, promovendo dessa forma uma alta especificidade (Arcus; Mulholland, 2020).

As proteases então purificadas ou obtidas de extrato bruto mais caracterizadas bioquimicamente, podem ser utilizadas como suplementação nutricional para animais, sobretudo em aves, pois essas enzimas apresentam potencial para melhorar a digestibilidade de nutrientes, reforçam a imunidade e mitigam efeitos oriundos do estresse térmico em frangos de corte (Patra *et al.*, 2019; YAO, *et al.*, 2023). O estresse por calor é um dos principais desafios na avicultura, comprometendo o bem-estar das aves e causando perdas econômicas significativas. Essa condição é agravada em linhagens modernas de frangos de corte, cuja elevada atividade metabólica aumenta a suscetibilidade a altas temperaturas (Deeb e Cahaner, 2002). Entre os efeitos observados estão redução no consumo alimentar, menor crescimento, queda na imunidade e aumento na mortalidade, exigindo estratégias eficazes de mitigação (Rath *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2020).

Neste sentido a referida tese teve por objetivo extrair, purificar, caracterizar e analisar a toxicidade das proteases obtidas a partir da casca do fruto da castanheira-do-Gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke) além de aplicar as referidas enzimas em rações para frangos de corte sob condições de estresse térmico.

CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO

1.2 *Dipteryx Lacunifera* Ducke

A vegetação brasileira possui uma rica diversidade espécies de plantas que refletem 20% da flora mundial. Em um recorte dentro desta escala nacional, o Cerrado brasileiro é o segundo maior bioma do país e da América do Sul, o incluindo no grupo dos 25 maiores sítios de biodiversidade do mundo, também levando em conta a biodiversidade vegetal (Arruda *et al.*, 2022). Nesse sentido, o Cerrado Brasileiro possui um vasto repositório de espécies nativas frutíferas, muitas já exploradas pelo homem através do extrativismo como é o caso do pequi, jatobá, baru, cagaita, mangaba (Silva *et al.*, 2001). Porém, estudos científicos envolvendo espécies frutíferas do cerrado e especificamente, do cerrado do Meio-Norte, ainda são escassos como é o caso da Castanheira do Gurgueia (*Dipteryx lacunifera* Ducke), com relação a esta espécie há a importância de ser mais exploradas para a sobrevivência da fauna silvestre e do seu uso alimentar pela população local (Abdala *et al.*, 2002).

A *Dipteryx lacunifera* Ducke, mais conhecida como Castanha do Gurgueia, fava do morcego ou Garampara (Figura 1) é uma espécie frutífera pertencente à família *Leguminosae* com vasta ocorrência no Cerrado do sudeste piauiense, especificamente no município de Bom Jesus – Piauí, Brasil, onde sua presença é notada nas feiras ao ar livre (Ribeiro *et al.*, 2012).

Figura 1 - Árvore da Castanheira do Gurgueia (*Dipteryx lacunifera* Ducke).



Fonte: Arquivo Pessoal

Essa espécie costuma florescer durante os meses de janeiro a fevereiro, e a maturação dos frutos a partir de setembro (Falcão Neto *et al.*, 2011). A árvore possui altura que varia de 6 a 10 metros, sua copa de formato oval alcançando de 4 a 5 metros de diâmetro a madeira considerada bem resistente e por essa característica é muito utilizada como postes para cercas. O fruto da castanha-do-gurguéia possui uma cápsula lenhosa (Figura 2), unilocular, de cor marrom bastante resistente e de sabor agradável (Souza e Menezes, 2006; Gutkosk *et al.*, 2007).

Figura 2 - Fruto da Castanheira do Gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke).



Fonte: Arquivo pessoal.

As sementes da *D. lacunifera* Ducke, consumidas tanto torradas quanto *in natura* e frequentemente comercializadas em feiras livres, apresentam múltiplos usos. Além disso, a extração do óleo essencial presente nas cascas da fruta desponta como uma alternativa promissora para a indústria farmacêutica (Vieira Junior *et al.*, 2007).

A castanha dessa espécie (Figura 3), considerada uma frutífera comercial, possui elevado teor de lipídios (45,6%) e quantidades moderadas de proteínas (14,1%) e cinzas (2,5%), sendo uma excelente opção para a formulação de barras de cereais. Carvalho (2008) destaca o valor nutricional das castanhas, cuja composição química média, por 100 gramas, inclui: 18,6 g de proteínas, 254 mg de cálcio, 475 mg de fósforo, 4,4 mg de ferro e 0,67 mg de vitamina B2. Por serem ricas em lipídios e proteínas, essas amêndoas apresentam um elevado potencial nutritivo.

Figura 3 - A - Parte interna do fruto da Castanheira do Gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke) e B – Castanha da *D.lacunifera* Ducke.



Fonte: Arquivo pessoal.

As amêndoas também representam uma importante fonte de alimento, não apenas para polinizadores que se nutrem de suas flores, mas também para diversas classes de animais. Durante os períodos de estiagem, quando os recursos alimentares são escassos, o gado solto se alimenta das amêndoas ao encontrar os frutos no campo. Após a ruminação, essas amêndoas são expelidas, geralmente sem a polpa, por meio das fezes ou pela boca, contribuindo para a dispersão das sementes (Carvalho *et al.*, 2008).

Além disso, estudos aprofundados sobre as espécies do Cerrado poderiam incentivar ações voltadas à preservação deste bioma, que vem sendo gradativamente devastado para fins comerciais nas últimas três décadas (Vera *et al.*, 2009). Mais pesquisas deveriam ser realizadas, especialmente para explorar a utilização das cascas da *D. lacunifera* Ducke, que aparentam possuir um alto teor de biomoléculas com potencial de interesse biotecnológico.

1.3 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

O Brasil possui uma das maiores atividades agrícolas e agropecuárias do mundo, consequentemente acaba ocasionando a produção de grandes quantidades de resíduos, estima-se que uma parte desses materiais participem na transformação de processamentos de matérias primas derivadas da agropecuária, auxiliando a inclusão de pequenos produtores do meio rural bem como na economia de mercado nacional e internacional. Com pesquisas mais aprofundadas na área da agroindústria, é possível melhorar a qualidade dos produtos, avaliar formas de reaproveitar e biotransformar os resíduos para diversas finalidades (EMBRAPA, 2020).

Resíduos agroindustriais são gerados a partir de processamentos agrícola e industrial, tais como: processamento de carnes, colheita de culturas e consumo de alimentos (Sadh *et al.*, 2018; Kaul *et al.*, 2024). Nesse termo são inclusos vários materiais, como resíduos de colheitas, cascas, palhas, caules e cascas de frutas/vegetais. As indústrias agrícolas e alimentícias produzem uma grande quantidade de resíduos, parte dos quais é passada por tratamento para prevenir problemas ambientais e a outra parte é reaproveitada como fertilizante para o solo ou ração animal.

Com o crescimento previsto da população global para aproximadamente 9,3 bilhões até 2050, o volume de resíduos gera desafios ambientais, econômicos e de sustentabilidade (Fierascu *et al.*, 2019). Comercialmente, os resíduos agroindustriais oferecem inúmeros benefícios devido ao seu rico conteúdo de matéria orgânica e nutrientes, tornando seu uso como matéria-prima uma abordagem ecológica e econômica. Essa estratégia não apenas oferece a oportunidade de produzir produtos de valor agregado, como enzimas, biocombustíveis, vitaminas, rações animais, fertilizantes e antioxidantes, mas também contribui para a redução de resíduos e eficiência no uso de recursos (Dilucia *et al.*, 2020).

A agroindústria realiza a transformação e o processamento de matérias-primas provenientes da agricultura, pecuária, aquicultura e silvicultura, convertendo-as em produtos. Ela pode ser entendida como o setor industrial que abrange a produção de alimentos, além de outros itens de origem agropecuária com finalidades alimentares e não alimentares (Viana; Cruz, 2016).

A inclusão de resíduos agropecuários inadequados para o consumo humano na alimentação animal é uma estratégia promissora para diminuir os impactos ambientais da pecuária e reduzir a competição por alimentos. Esses resíduos serão resultados de processos agroindustriais, como o beneficiamento de grãos, a destilaria, a produção de biodiesel, o processamento de frutas e vegetais, entre outros (Salami *et al.*, 2019).

Os resíduos ainda podem ser divididos em orgânicos e inorgânicos. Os orgânicos incluem aqueles gerados dos setores agrícola e pecuário como por exemplo café, cacau, soja, milho, entre outros, resíduos de criação animal e efluentes e resíduos originados em agroindústrias, como abatedouros, laticínios e graxarias.

Uma fonte natural e inorgânica rica em compostos fenólicos é o Líquido da Casca de Castanha-de-Caju (LCC) que produz o cardanol utilizado como revestimento protetor de aço carbono contra corrosão, considerado um resíduo da indústria do agronegócio do caju (*Anacardium occidentale* L.) e de baixo valor econômico (BUONO *et al.*, 2018). Outro exemplo de resíduo orgânico destaca-se uma biomassa residual com potencial energético na Amazônia,

a Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), é também conhecida como castanha verdadeira, castanheira e castanha do Pará. Suas cascas são reaproveitadas pra a produção de carvão, este produto tem o potencial para agregar valor a uma parte do material que normalmente é descartado. (De Sousa *et al.*, 2021). Já os inorgânicos compreendem embalagens de agrotóxicos, fertilizantes e insumos farmacêuticos veterinários, além dos resíduos sólidos provenientes de áreas rurais (Rodrigues *et al.*, 2013).

O processo industrial, especialmente na indústria alimentícia, é uma das principais fontes de subprodutos, gerando resíduos a partir do processamento de frutas e vegetais para a fabricação de sucos, rações e até biocombustíveis. Esses subprodutos possuem potencial de reaproveitamento devido à presença de composto como glicose, frutose, pectinas, mucilagens e gomas, que são fibras alimentares, além de ácidos fenólicos, carotenóides, vitaminas e outros nutrientes. Além do valor nutricional, esses componentes têm aplicações em diversas áreas, incluindo a produção de medicamentos e cosméticos, pois possuem atividades biológicas variadas (Kowalska *et al.*, 2017; Ferrentino *et al.*, 2018).

A perda de produtos agrícolas ocorre em várias etapas da cadeia produtiva: cerca de 10% durante a colheita, 50% nas fases de transporte e industrialização, e aproximadamente 10% no preparo de alimentos em residências. Assim, estima-se que o aproveitamento das matérias-primas vegetais não ultrapasse 85%, com a geração de resíduo de 30 a 40%. (Roriz, 2012).

A crescente preocupação com o meio ambiente tem incentivado as indústrias e o comércio a se mobilizarem para reduzir e reaproveitar resíduos. Em várias partes do mundo, tanto as instituições governamentais quanto as empresas estão implementando políticas de preservação ambiental com o intuito de minimizar os impactos gerados pelas atividades industriais. Uma parcela desses riscos significativos resulta da falta de planejamento adequado no gerenciamento do descarte desses resíduos (Giordani Junior *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, atenção tem-se voltado para a minimização e ao reaproveitamento de resíduos, independentemente de sua forma ou finalidade. Os materiais provenientes da agroindústria são aproveitados como fonte de matéria orgânica, além de fornecerem proteínas, enzimas, óleos essenciais e, potencialmente, componentes para novas formulações (Coelho *et al.*, 2001).

Outro fator importante na operação de utilização dos resíduos agroindustriais é a forma como eles serão tratados, uma vez que influencia diretamente na sua utilização, pois o teor de umidade e a carga microbiana dependem desse processamento. Quando o descarte é destinado ao cultivo de microrganismos, após sua geração, deve-se realizar uma série de etapas: transporte, armazenamento, pré-tratamento ou esterilização (quando necessário), formulação

de um meio de cultivo, realização do cultivo, por fim, processamento do material fermentado (Woiciechowski *et al.*, 2020).

Os pré-tratamento dos resíduos podem ser físicos, químicos ou biológicos. Os pré-tratamentos físicos envolvem a redução do tamanho ou a alteração estrutural da biomassa, enquanto os químicos atuam removendo barreiras químicas que dificultam a ação das enzimas. Já para os biológicos utilizam microrganismos para atingir os mesmos objetivos, facilitando a transformação da biomassa (Diaz; Blandino; Caro, 2018).

Para os resíduos agroindustriais que passam pela etapa de hidrólise para produzir açúcares fermentáveis, pode ser realizado por meio de produtos químicos, como ácidos (ácido sulfúrico, ácido clorídrico), líquidos iônicos ou enzimas (celulases, hemicelulases, pectinases). Quanto aos ácidos, o tempo de retenção pode ser mais curto e os custos mais baixos, embora também apresente algumas desvantagens, incluindo a geração de compostos inibidores. Para a etapa de fermentação, utiliza-se de altas temperaturas e podendo ter problemas de corrosão nos reatores. Para a hidrólise enzimática, embora a necessidade de maior tempo de retenção e o custo das enzimas, pode-se operar em temperaturas e faixas de pH mais baixas, podendo evitar problemas com a corrosão (Kumar; Singh; Korstad, 2017).

Dentre a produção de bioprodutos produzidos de grande interesse industrial estão as enzimas, moléculas proteicas que auxiliam em diversas reações biológicas como no processamento de informações celulares, controle de interações proteína-proteína, produção de moléculas bioativas, incluindo replicação e transcrição do DNA, proliferação e diferenciação celular, remodelação e morfogênese de tecidos (Sarode *et al.*, 2024).

1.4 PROTEASES: FUNÇÕES, IMPORTÂNCIA E APLICAÇÕES

As enzimas vêm obtendo grandes avanços na indústria de biotecnologia devido sua relação do custo-benefícios e por ser biodegradável (Gimenes *et al.*, 2021). Segundo o mercado global de enzimas em aplicações industriais deve crescer de US\$ 6,4 bilhões em 2021 para US\$ 8,7 bilhões até 2026, a uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) de 6,3% para o período de 2021-2026 (Sellami *et al.*, 2022). Por sua aplicabilidade em diversos setores como as indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícia as enzimas tem sido alvo de grande interesse e estudos. (Kermasha & Eskin, 2021).

Enzimas podem ser denominadas como proteolíticas ou peptidases com a capacidade de quebrar ligações peptídicas. Segundo o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB, 2022) dentro dessa classificação, as

proteínases são definidas como um subgrupo de hidrolases especializada na clivagem dessas ligações pertencentes à classe 3, enquanto as peptidases estão incluídas na subclasse 4. Embora a maioria das proteínas sejam como as hidrolases, existem variações nos mecanismos catalíticos que diferenciam algumas delas (Paul *et al.*, 2019; Gimenes *et al.*, 2021).

A especificidade de uma peptidase é definida por sua interação com substratos e inibidores, permitindo a diferenciação entre peptidases homólogas. O processo de hidrólise, geralmente baseado em uma ocorrência ácido-base, envolve o ataque nucleofílico à ligação peptídica no sítio ativo, resultando na formação de um intermediário acil. Esse intermediário é posteriormente decomposto, com a transferência de um próton para um resíduo básico da protease, o que promove a clivagem da ligação peptídica e a incorporação de uma molécula de água no processo (Rawlings *et al.*, 2014).

Dentre muitas características a utilização de enzimas como catalisadores está na sua alta especificidade quanto ao substrato, além disso ao trabalhar com o processamento de enzimas requer cuidados com altas temperaturas pois pode ocorrer a desnaturação, bem como cuidados também com o pH ideal e pressão. Todas estas características se tornam vantajosas para a indústria (Justina; Justina; Skoronski, 2018). Outro ponto positivo para as enzimas é pelo poder catalítico ser maior do que catalisadores sintéticos ou inorgânicos, tornando-se capazes de aumentar a velocidade de uma reação a 10^3 , podendo chegar até 10^{17} , e tudo isso pela sua alta especificidade que as tornam bastante seletivas (Ferrier, 2019; Nelson; Cox; Hoskins, 2022).

As proteases podem ser extraídas essencialmente de três fontes: nos animais, vegetal e microbiana. Nas plantas as enzimas podem ser encontradas nas folhas, sementes, frutos dentre outros. Em animais podem ser encontradas enzimas dentro do próprio organismo como é o caso da víbora *Echis pyramidum* que estão presentes em suas peçonhas. Endêmica no Nordeste da África e na Península Arábica pois possui um veneno que pode desencadear a desregulação na coagulação sanguínea de um indivíduo. Pesquisadores investigaram a desintoxicação do veneno através da aplicação de raios gama sobre as metaloproteases presentes na peçonha, constatando grande sucesso no uso das metaloproteases (El-Yamany *et al.*, 2020).

Para proteases extraídas por microrganismos pode ser utilizado por meio de bactérias, leveduras e fungos filamentosos produzidos através de fermentação. Estudo publicado por Gimenes *et al.* (2021) relatam que a produção por fermentação é responsável por mais 40% de vendas mundiais apresentando características vantajosas para aplicação biotecnológica dentre elas a fácil recuperação de enzimas cultivados em meios sólidos ou líquido e alta produtividade de biocompostos extracelulares.

Para a aplicação dessas proteases nas indústrias, a biotecnologia está presente envolvendo diversas áreas da ciência e tecnologia visando o uso de novas matérias-primas e melhoria no processamento. A obtenção de enzimas comerciais é fundamental para garantir o êxito e a qualidade do produto final. É importante enfatizar o cuidado das indústrias a manipular as enzimas como fatores de relacionado a toxicidade dessas moléculas, e condições leves no processamento, para preservar sua alta especificidade e principalmente ao seu alto poder catalítico. Por conta disso, atualmente a aplicação de proteases se dá em diversos setores da indústria alimentícia, como a panificação, cervejaria, laticínios, carnes, entre outros (Moraes, 2021).

No setor de laticínios as proteases são utilizadas principalmente nos processos de coagulação do leite (para obtenção de queijos) (Justina; Justina; Skoronski, 2018). Nas indústrias carnes, a obtenção de enzimas comerciais desempenha um papel crucial na fabricação de amaciantes assegurando a qualidade do produto, na panificação as proteases irão atuar na degradação do glúten, trazendo modificações na massa, entre outras aplicações que se estende a diversos outros setores. (Nascimento *et al.*, 2021).

1.5 APLICAÇÃO DAS PROTEASES NA NUTRIÇÃO ANIMAL

O aumento dos custos dos insumos utilizados na nutrição animal, especialmente do farelo de soja, principal fonte de proteína na alimentação de aves, tem incentivado o desenvolvimento de estratégias que melhorem a eficiência das dietas e reduzam custos. As proteases, enzimas exógenas que complementam as endógenas, apresentam grande potencial nesse contexto por promoverem a digestibilidade de proteínas e aumentarem a disponibilidade de aminoácidos essenciais, além de contribuírem para a sustentabilidade da produção animal (Borda-Molina *et al.*, 2019).

Existem duas formas principais de inclusão de enzimas na dieta. O método "*on top*" que consiste em adicionar as enzimas sobre uma formulação padrão sem alterar os níveis nutricionais. Essa abordagem pode resultar em custos mais elevados, devido ao excesso de nutrientes que, caso não sejam aproveitados, serão excretados ou convertidos em gordura (Lecznieski *et al.*, 2006).

Outra forma de suplementação envolve a inclusão de enzimas em dietas formuladas com menores níveis de nutrientes, restaurando seu valor nutricional e mantendo o desempenho das aves. Essa estratégia visa reduzir custos, mantendo a eficiência da alimentação (Barbosa *et al.*, 2008).

As proteases são especialmente eficazes na degradação de fatores antinutricionais presentes nos alimentos, como os inibidores de tripsina, e na quebra de proteínas que não seriam normalmente degradadas pelas enzimas digestivas do animal. Esse processo melhora a digestibilidade de aminoácidos como treonina e cistina, que apresentam menores índices de absorção (Cowieson *et al.*, 2010).

A suplementação de proteases em rações para aves contribui para a redução da proteína bruta na dieta sem comprometer o desempenho zootécnico, reduzindo a excreção de nitrogênio nos dejetos e diminuindo os impactos ambientais (Leinonen & Williams, 2015; Cowieson & Roos, 2016). Os benefícios das proteases vão além da digestibilidade. Estudos apontam melhorias na saúde intestinal, incluindo maior estabilidade entérica, equilíbrio microbiano, aumento da integridade das vilosidades intestinais e redução da viscosidade no lúmen intestinal (Freitas *et al.*, 2011; Lio *et al.*, 2013; Cowieson *et al.*, 2016).

Além disso, o uso de proteases auxilia na retenção de cálcio e fósforo, favorecendo o desempenho dos animais (Olukosi *et al.*, 2015). Na produção de aves, as proteases têm demonstrado melhorias significativas nos parâmetros produtivos, como ganho de peso, eficiência alimentar e qualidade dos ovos em poedeiras (Vieira *et al.*, 2016; Santos, 2020). Em frangos de corte, as proteases aumentam a digestibilidade dos nutrientes, melhoram a morfometria intestinal e promovem maior resistência do trato gastrointestinal, reduzindo o fluxo de proteínas mal digeridas para o intestino grosso e diminuindo o substrato para o crescimento de bactérias patogênicas, como *Clostridium perfringens* (Kamel *et al.*, 2015; Cowieson & Roos, 2016).

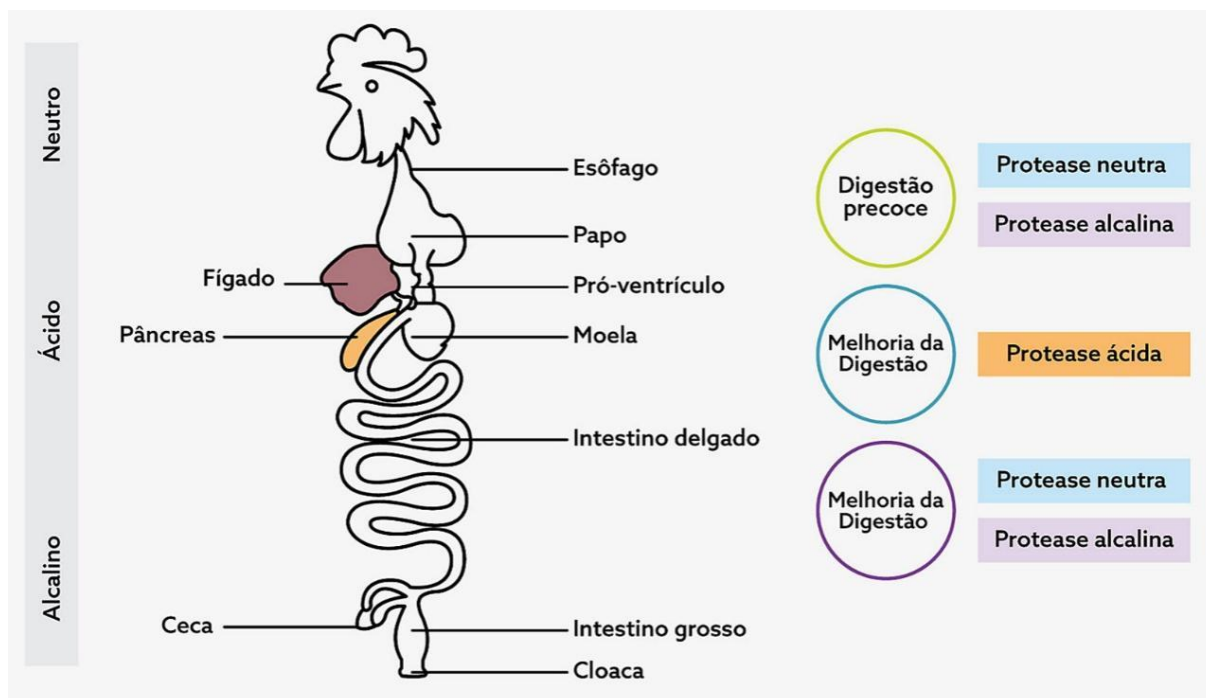
Os efeitos econômicos do uso de proteases também são expressivos, contribuindo para a redução do custo das rações em até 15 dólares por tonelada (Cowieson & Kluenter, 2018). Dessa forma, a inclusão de proteases na nutrição animal não apenas promove maior eficiência no uso dos nutrientes, mas também melhora a saúde intestinal e reduz os impactos ambientais, consolidando-se como uma estratégia fundamental diante do aumento dos custos das matérias-primas e da necessidade de produção sustentável.

1.6 AÇÃO DAS PROTEASES NA FISIOLÓGIA DIGESTIVA DAS AVES

A digestão das proteínas em aves tem início no proventrículo, uma vez que não se considera que a boca, o esôfago ou o ingluvio realizem digestão enzimática ou mecânica do alimento. Essa fase inicial, conhecida como fase gástrica, é marcada pela secreção de ácido clorídrico e pepsina. Durante essa etapa, o pH do estômago reduz-se para 2,6, permitindo que

a pepsina atue nas ligações proteicas, quebrando grandes moléculas em peptídeos. (Figura 4). Além disso, a motilidade do proventrículo e da moela contribui para a trituração e digestão do alimento, que, após essa fase, é transportado para o duodeno, onde a proteína já parcialmente digerida continua seu processo (Bedford, 2000; Macari et al., 2002).

Figura 4 - pH das diferentes porcoes do sistema digestivo da ave com respectiva protease adequada.



Fonte: Adaptado de KID-BR-20-18051, retirado de

<https://www.kemin.com/sa/pt/markets/animal/products/kemzyme-protease>.

Na fase intestinal, que se inicia no duodeno, ocorre a secreção de proteases neutras pelo pâncreas, como tripsina, quimotripsina, elastase e carboxipeptidases, que são essenciais para a digestão das proteínas (Bedford & Cowieson, 2018). As proteases produzidas no intestino delgado são classificadas em três grupos: endopeptidases, exopeptidases (ambas originadas do pâncreas) e aminopeptidases, que são secretadas pelas células epiteliais da mucosa intestinal (Pelucio & Batista, 2008). As endopeptidases e exopeptidases atuam no lúmen intestinal, hidrolisando a maior parte do bolo alimentar. No entanto, dependendo dos níveis de proteína na dieta, alguns peptídeos podem ser resistentes à hidrólise luminal.

Para complementar a digestão dos peptídeos no duodeno, as aminopolipeptidases e dipeptidases, produzidas no intestino delgado, quebram as proteínas em tripeptídeos, dipeptídeos e aminoácidos. Vale destacar que, durante a primeira semana de vida das aves, a

produção de pepsina gástrica e suco gástrico é insuficiente para a degradação adequada das proteínas (El-Haroun et al., 2006; Shi et al., 2016).

1.7 INFLUENCIA DO ESTRESSE POR CALOR EM FRANGOS DE CORTE

A produção de frangos de corte desempenha um papel estratégico na segurança alimentar global, sendo uma das principais fontes de proteína animal consumida em todo o mundo (Hosseintabar-Ghasemabad et al., 2024). Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2024), em 2023, o Brasil produziu 14,833 milhões de toneladas de carne de frango, resultando em um valor bruto de produção de R\$ 91,6 bilhões, estabelecendo-se como o segundo maior produtor mundial. Além disso, o país destacou-se como o maior exportador, enviando 5,139 milhões de toneladas para 150 países, gerando uma receita de US\$ 9,7 bilhões. Entretanto, a avicultura enfrenta desafios significativos, especialmente em regiões tropicais, onde as condições climáticas são mais adversas (Hosseintabar-Ghasemabad et al., 2024). Segundo esses autores, o estresse térmico, causado por altas temperaturas ambientais, pode prejudicar a saúde das aves, afetando negativamente seu desempenho zootécnico e, consequentemente, a produção de carne para o mercado consumidor.

Essas condições dificultam o manejo adequado, com o estresse térmico sendo um dos principais problemas enfrentados pela produção avícola em ambientes de calor intenso. Ele ocorre quando a temperatura ambiental excede a zona de conforto térmico das aves, prejudicando sua homeotermia e reduzindo a eficiência produtiva (Ferreira, 2016). A faixa de conforto térmico para frangos de corte corresponde à temperatura em que as aves mantêm um desempenho produtivo ideal, sem a necessidade de mecanismos adicionais para dissipação ou retenção de calor. Essa faixa varia conforme a idade das aves como pode ser observado na Tabela 1. Na primeira semana, a temperatura ideal está entre 32°C e 34°C (Macari et al., 2004), na segunda semana entre 28°C e 32°C (Macari et al., 2004) e na terceira semana entre 26°C e 28°C (Medeiros et al., 2005).

Tabela 2 - Temperatura ambiente para o conforto térmico na criação de frangos de corte.

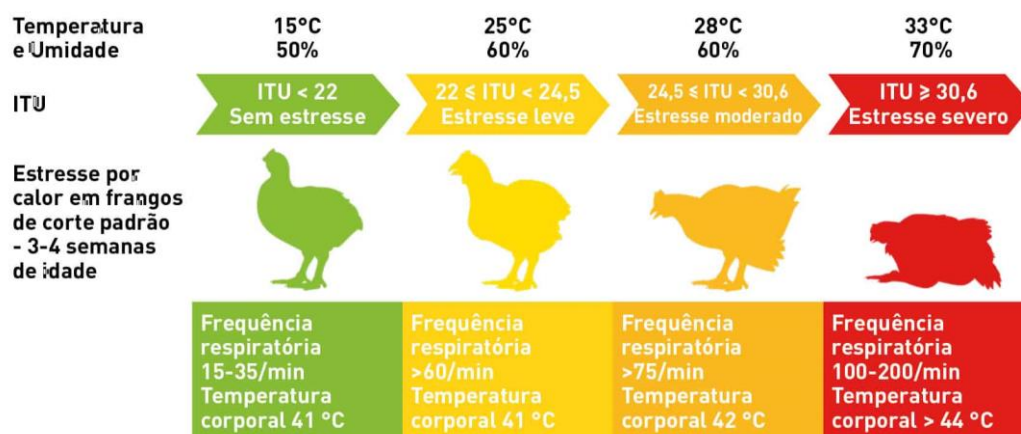
Idade (dias)	Temperatura Mínima (°C)	Temperatura Ideal (°C)	Temperatura Limite (°C)
1	31	32	33
7	28	29	30
14	26	27	28
21	24	25	26
28	22	23	25
35 até o abate	20	22	24

Fonte: adaptado do Manual de Frangos de Corte da Cobb.

Temperaturas fora dessa faixa provocam estresse térmico, prejudicando o consumo alimentar, o ganho de peso e a saúde das aves. As aves enfrentam dificuldades em termorregular no calor devido, entre outros fatores, à ausência de glândulas sudoríparas, o que compromete sua capacidade de manter a temperatura corporal estável (Chowdhury et al. 2012). Para evitar a hipertermia, elas precisam equilibrar o calor absorvido com o calor perdido para o ambiente (Nawab et al. 2018). Quando a temperatura do ar ultrapassa a temperatura corporal, a perda de calor por evaporação se torna fundamental (Figura 5). A respiração ofegante é o principal mecanismo utilizado pelas aves para dissipar o calor, mas esse comportamento reduz a ingestão de alimento, pois a cavidade bucal não pode realizar ambas as funções simultaneamente (Mack et al. 2013).

Além disso, as aves recorrem a outros comportamentos, como abrir as asas, deitar-se ou procurar áreas mais frescas dentro do galpão, para aumentar a perda de calor por condução (Rath et al. 2015; Gbedemah et al. 2018). A vasodilatação periférica também desempenha um papel importante na transferência de calor para a pele e vias respiratórias (Nolan et al. 1978). Devido à sua maior atividade metabólica, as linhagens modernas de aves produzem mais calor corporal e, por isso, são mais susceptíveis aos efeitos do estresse térmico (Deeb e Cahaner, 2002).

Figura 5 - Efeitos combinados da temperatura ambiente e da umidade relativa para definir o nível do estresse por calor.



Fonte: https://phileo-lesaffre.com/wp-content/uploads/2021/05/Heat-Stress-broiler_PT-1.jpg

O estresse térmico resulta em redução no consumo de ração, queda na taxa de crescimento e menor eficiência na conversão alimentar (Liu, et al., 2020). Além disso, o calor excessivo pode comprometer o sistema imunológico das aves, tornando-as mais vulneráveis a doenças (Hirakawa, et al., 2020). Em casos mais severos, o estresse térmico pode levar à mortalidade elevada, causando perdas econômicas significativas para os produtores (Rath et al. 2015; Liu, et al., 2020). Diante desses desafios, o setor avícola tem investido em tecnologias e abordagens estratégicas para reduzir os impactos do estresse térmico. Entre essas estratégias estão a melhoria do ambiente físico das instalações, o uso de sistemas de climatização e ventilação, além de ajustes nutricionais que incluem a utilização de aditivos, como enzimas e compostos bioativos (Vandana et al., 2021).

REFERÊNCIAS

- ABDALA, L. *et al.* Biochemical traits useful for the determination of genetic variation in a natural population of *Myracrodruon urundeuva*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v.37, n.7, p.909- 916, 2002.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. Relatório Anual 2024: Carne de Frango. São Paulo: ABPA, 2024. Disponível em: https://abpabr.org/wp-content/uploads/2024/04/ABPA-Relatorio-Anual2024_capa_frango.pdf. Acesso em: 23 dez. 2024.
- ARCUS, V. L., MULHOLLAND, A. J. Temperature, Dynamics, and Enzyme-Catalyzed Reaction Rates. **Annual Review of Biophysics**, v. 49, p. 163-180, 2020. doi: 10.1146/annurev-biophys-121219-081520. Epub 2020 Feb 4. PMID: 32040931.
- ARRUDA, H.S., ARAÚJO, M.V.L., JUNIOR, M.R.M. Underexploited Brazilian Cerrado fruits as sources of phenolic compounds for diseases management: A review. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 5, p.1-22, 2022.
- BARBOSA N.A. A.; SAKOMURA, N. K.; FERNANDES, J. B. K.; DOURADO, L. R. B. Enzimas exógenas no desempenho e na digestibilidade ideal de nutrientes em frangos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 6, p. 755-762, 2008.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; SALVESEN, G.; WOESSNER, F. J. **Introduction. In Handbook of Proteolytic Enzymes**, 3rd ed.; Rawlings, N. D., Salvesen, G., Eds.; Academic Press: London, UK, 2013, pp li–liv. DOI: 10.1016/B978-0-12-382219-2.00838-3. 2013.
- BEDFORD, M. R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition—their current value and future benefits. **Animal Feed Science and Technology**, 86(1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(00\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(00)00155-3). (2000).
- BEDFORD, M. R., & COWIESON, A. J. Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. **Animal Feed Science and Technology**, 173(1–2), 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.018>. (2018).
- BORDA-MOLINA, Daniel *et al.* Effects of protease and phytase supplements on small intestinal microbiota and amino acid digestibility in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 98, n. 7, p. 2906-2918, 2019.

BUONO, P.; DUVAL, A.; AVÉROUS, LUC.; HABIBI, Y. Clicking Biobased Polyphenols: A Sustainable Platform for Aromatic Polymeric Materials. **ChemSusChem**, [S.l.], v. 11, n. 15, p. 2472-2491, 2018.

CARVALHO, M. G., *et al.* Avaliação dos parâmetros físicos e nutricionais de amêndoas de chichá, sapucaia e Castanha-do-Gurguéia. *Revista Ciência Agronômica*, v. 39, n. 4, p. 517-523, 2008.

CARVALHO, M.G. *et al.* **Barras de cereais com amêndoas de chichá, sapucaia e castanha-dogurgueia, complementadas com casca de abacaxi**. 2008. 92f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

CAVALCANTE, I. H. L.; OSAJIMA, J. A.; FALCÃO NETO, R.; SILVA, R. L. Gurguéia nut: a new and potential fruit crop. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2015.

COELHO, M. A. Z. *et al.* **Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais: Produção de Enzimas a Partir da Casca de Coco Verde**. Revista B. Ceppa, Curitiba – Paraná, Brasil, v. 19, n. 1, p. 33-42, jan-jun/2001.

COWIESON, A. J, BEDFORD, M. R, RAVINDRAN, V. Interactions between xylanase and glucanase in maize-soy-based diets for broilers. **British Poultry Science**, v. 51, p. 246–257, 2010.

COWIESON, A. J., KLUENTER, A. M. Contribution of exogenous enzymes to potentiate the removal of antibiotic growth promoters in poultry production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 250, p. 91–92. 2018.

COWIESON, A. J., LU, H., AJUWON, K., KNAP, I., ADEOLA, O. Interactive effects of dietary protein source and exogenous protease on growth performance, immune competence and jejunal health of broiler chickens. **Animal Production**, v. 57, n.2, 2016.

COWIESON, A. J., ROOS, F. F. Toward optimal value creation through the application of exogenous mono-component protease in the diets of non-ruminants. **Feed Science and Technology**, v. 221, p. 331–340. 2016.

CHOWDHURY VS, TOMONAGA S, NISHIMURA S, TABATA S, FURUSE M. Physiological and behavioral responses of young chicks to high ambient 23temperature. **Journal of Poultry Sciencie** 2012. <https://doi.org/10.2141/jpsa.011071A>.

DEEB, N., CAHANER, A. **Genotype-by-environment interaction with broiler genotypes differing in growth rate**. 3. Growth rate and water consumption of broiler, 2002.

DE CARVALHO, M. G. *et al.* Avaliação dos parâmetros físicos e nutricionais de amêndoas de chichá, sapucaia e castanha-do-gurguéia. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 4, p. 517-523, 2008.

DE SOUZA, E. S. R. *et al.* **Pesquisas em temas de ciências biológicas**, v.1 . RFB Editora.2020.

DE SOUZA, Cristiane Daliassi Ramos; DA SILVA, Kleyner de Carvalho. Potencial energético dos resíduos da castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* HBK) para produção de carvão ativado. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e53310212698-e53310212698, 2021.

DIAZ, A. B.; BLANDINO, A.; CARO, I. Value added products from fermentation of sugars derived from agro-food residues. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 52–64, 2018.

DILUCIA, F., LACIVITA, V., CONTE, A., DEL NOBILE, M.A.,. Sustainable use of fruit and vegetable by-products to enhance food packaging performance. **Foods** 9, 857. 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9070857>.

ELHAMDI, M.; GHORBEL, S.; HMIDET, N. *Bacillus swezeyi* B2 strain: a novel alkaliphilic bacterium producer of alkaline-, thermal, oxidant-, and surfactant-stable protease, extremely efficient in detergency, **Current Microbiology**, v. 80, n. 95, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03156-1>.

EL-HAROON, E. R., GODA, A. M. A., & CHOWDHURY, M. A. K. Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture Research**, 37(14), 1473–1480. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01584.x>. (2006).

ELHAMDI, M.; BELHADJLETAIEF, C.; HMIDET, N.; GHORBEL, S. Proteases e queratinases de *Bacillus zhangzhouensis* MH1: Uso prático em processos de gestão de detergentes, couro e resíduos. **Revista Internacional de Macromoléculas Biológicas**, v. 284, Parte 1, janeiro de 2025, 138036,

EL-YAMANY, M. F. *et al.* Gamma irradiated protease from *Echis pyramidum* venom: A promising immunogen to improve viper bites treatment. **Toxicon**, v. 188, p. 108-116, 2020.

FADEL, H. H. Mohamed et al. Bioprodução de novas proteases e sabores de processo a partir de resíduos agroindustriais. **Medição: Alimentação**, v. 14, p. 100160, 2024.

FERREIRA, R. A. Maior produção com melhor ambiente para aves, suínos e bovinos. **Aprenda Fácil**, Viçosa, p. 296, 2016.

FERRENTINO, G., ASADUZZAMAN, M. D., & SCAMPICCHIO, M. M. Current technologies and new insights for the recovery of high valuable compounds from fruits by-products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 58(3), 386-404. 2018.

FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019. E-book. ISBN 9788582714867. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582714867/>. Acesso em: 16 NOV. 2024.

FIERASCU, R.C., FIERASCU, I., AVRAMESCU, S.M., SIENIAWSKA, E. Recovery of natural antioxidants from agro-industrial side streams through advanced extraction techniques. **Molecules**, v. 24, 4212. 2019.

FOCOS ON CATALYSTS. Global industrial enzymes market forecast to reach \$10.1 bn by 2030: microorganism-based enzymes to experience notable expansion. **Focos on Catalysts**, v. 2024. p.3, 2024.

FREITAS, D. M., VIEIRA, S. L., ANGEL, C. R., FAVERO, A., MAIORKA, A. Performance and nutrient utilization of broilers fed diets Supplemented with a novel monocomponent protease. **Journal Applied Poultry Research**. v. 20, p. 347–352, 2011.

GBEDEMAH, S; TORGBOR, F; KUFOGBE, S . Adaptation strategies of poultry farmers to rising temperature in the Greater Accra region of Ghana. **West African Journal Applied Ecology**, v. 26, p. 41 – 55, 2018.

GIMENES, N. C.; SILVEIRA, E.; TAMBOURGI, E. B. An overview of proteases: production, downstream processes and industrial applications. **Separation & Purification Reviews**, v. 50, n. 3, p. 223-243, 2021.

GIORDANI, J. *et al.* **Resíduos Agroindustriais e Alimentação de Ruminantes**. Revista Brasileira de Ciências da Amazônia, Porto Velho – Rondônia, Brasil, v. 3, n. 1, p. 93-104, 2014.

GONG, M., AGUIRRE, A.M., BASSI, A. **Technical Issues Related to Characterization, Extraction, Recovery, and Purification of Proteins from Different Waste Sources**. 1º ed. Academic Press, p.89-106, 2016.

HADJIDJ, R. *et al.* Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* strain K7A, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 1033–1048, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.167>.

HEJDYSZ, M. *et al.* The effect of protease and *Bacillus licheniformis* on nutritional value of pea, faba bean, yellow lupin and narrow-leaved lupin in broiler chicken diets. **Br Poultry Sci.** v. 61, p. 3, p. 287–293, 2020.

HIRAKAWA, R. *et al.* Heat stress causes immune abnormalities via massive damage to effect proliferation and differentiation of lymphocytes in broiler chickens. **Frontiers in veterinary science**, v. 7, p. 46, 2020.

HOSSEINTABAR-GHASEMABAD, Babak; BAGHBAN-KANANI, Payam; SEIDAVI, Alireza. Heat Stress in Broiler Chickens. **Animal Science Cases**, n. 2024, p. asc20240008, 2024.

INTELLIGENCE, M. Proteases Market - Growth, Trends, Covid-19 Impact, and Forecasts (2022-2027). [https://www.Mordorintelligence.Com/Industry Reports/Smart-Railways-Market](https://www.Mordorintelligence.Com/Industry_Reports/Smart-Railways-Market). Available: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-wearable-medical-device-market-industry.2021>.

IUBMB. Enzyme Database Statistics. Disponível em: <https://www.enzyme-database.org/class.php>. Acesso em: 18 Dez. 2024

JUSTINA, M. D.; JUSTINA, M. B. D.; SKORONSKI, E. O uso das enzimas na indústria de laticínios: uma breve revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n. 3, p. 172-184. 2018.

KAMEL, N. F., RAGA, N. M., EL-BANNA, R. A., & MOHAMED, F. F. Efeitos de uma protease monocomponente sobre parâmetros de desempenho e digestibilidade proteica em frangos de corte. **Anais de Agricultura e Ciências Agrárias**, v. 6, p. 216–225, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.08.062>.

KERMASHA, S.; ESKIN, M. N. **Enzymes**. In: KERMASHA, S.; ESKIN, M. N. *Enzymes Novel Biotechnological Approaches for the Food Industry*. 1 ed. Cambridge: Academic Press, 2021. cap 2, páginas 15-44. 2021.

KOWALSKA, H., CZAJKOWSKA, K., CICHOWSKA, J., & LENART, A. What's new in biopotential of fruit and vegetable by-products applied in the food processing industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, 150-159. 2017.

KUMAR, D.; SINGH, B.; KORSTAD, J. Utilization of lignocellulosic biomass by oleaginous yeast and bacteria for production of biodiesel and renewable diesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, n. October 2015, p. 654–671, 2017.

LECZNIESKI, J. L. **Considerações práticas do uso de enzimas**. Seminário Internacional de Aves e Suínos, Florianópolis, Brasil. Anais. Florianópolis: AVESUI. p. 34-46, 2006.

LEHNINGER, N. D. L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo. 2006.

LEINONEN, I., & WILLIAMS, A. G. Effects of dietary protease on nitrogen emissions from broiler production: a holistic comparison using life cycle assessment. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 95, p. 3041–3046, 2015. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7202>.

LIU, S. Y., SELLE, P. H., COURT, S. G., COWIESON, A. J. Protease supplementation of sorghum-based broiler diets enhances amino acid digestibility coefficients in four small intestinal sites and accelerates their rates of digestion. **Animal Feed Science Technology**, p. 175–183. 2019.

LIU, L. *et al.* Heat stress impacts on broiler performance: a systematic review and meta-analysis. **Poultry Science**, v. 99, n. 11, p. 6205-6211, 2020.

MARTÍNEZ, M., BARRUETO, T., YECID, P. J. Liquid-liquid extraction of molybdenum (VI) using aqueous two-phase systems (ATPS) consisting of polyethylene glycol (PEG) and sodium, ammonium and copper (II) salts: Comparison with conventional solvent extraction, **Hydrometallurgy**, v. 219, p. 106077, 2023.

MACARI, M., FURLAN, R. L., & GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Funep. (2002).

MACARI, M.; FURLAN, R.L.; MAIORKA, A. **Aspectos fisiológicos e de manejo para manutenção da homeostase térmica e controle de síndromes metabólicas**. In: MENDES, A.A.; NÄÄS, I.A.; MACARI, M. (Eds.) Produção de frangos de corte. Campinas: FACTA, 2004. P.137-155.

MACK, L. A *et al.* Genetic variations alter production and behavioral responses following heat stress in 2 strains of laying hens. **Poultry Science**, n. 92, v. (2), p. 285 – 294, 2013. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02589>.

MEDEIROS, M.M.; BAETA, F.C.; OLIVEIRA, R.F.M. et al. Efeitos da temperatura, umidade relativa e velocidade do ar em frangos de corte. **Engenharia na Agricultura**, v.13, n.4, p.277-286, 2005.

MONTEIRO, V. N., SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista processos químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MORAES, I. O. **Biotecnologia industrial, vol. 4 - Biotecnologia na produção de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Editora Blucher, 2021. E-book. ISBN 9786555061536. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/9786555061536/>. Acesso em: 22 NOV. 2024.

MOROHASHI, Y., TOMITA, T. Protein trafficking and maturation regulate intramembrane proteolysis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1828, n. 12, p. 2855-2861, 2013.

MUTLU, A., *et al.* The aspartic proteinase is expressed in *Arabidopsis thaliana* seeds and localized in the protein bodies. **Seed Science Research**. v-8. p 75 – 84. February. 2007.

NASCIMENTO, J. M. *et al.* **Extração de proteases fibrinolíticas de *Auricularia a. delicata* utilizando sistema de duas fases aquosas-SDFA formado por PEG/sulfato de sódio**. 2023. Trabalho de conclusão de curso.

NASCIMENTO, M. C. *et al.* Proteases e suas aplicações biotecnológicas nas indústrias alimentícias. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DA AGROINDÚSTRIA, 2., 2021, On-line. **Anais Ciagro 2021**. Recife: Instituto Internacional Despertando Vocações, 2021.

NASCIMENTO, T. P. *et al.* Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). **Journal of Chromatography B**, v. 1025, p. 16-24, 2016.

NAVEED, M., *et al.* Protease A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. **Catalysis Letters**. v. 151. p. 307-323, 2021.

NAWAB, A. *et al.* (2018) Heat stress in poultry production: mitigation strategies to overcome the future challenges facing the global poultry industry. **Journal of Thermal Biology**, n. 78, p. 131 – 139.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6º ed, Editora Artmed, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; HOSKINS, A. A. **Princípios de Bioquímica de Lehninger** v.1. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2022. E-book. ISBN 9786558820703. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/9786558820703/>. Acesso em: 16 NOV. 2024.

NETO, R. F. *et al.* Características biométricas de mudas de castanha-do-gurguéia em função de calagem e NPK. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 4, p. 940-949, 2011.

NOLAN, W. F; WEATHERS, W.W.; STURKIE, P. D. Thermally induced peripheral blood flow changes in chickens. **Journal Applied Physiology**, v. 44, n. 1, p. 81 – 84, 1978.

OLIVEIRA, V.B, et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v.48, p.170–179, 2012.

OLUKOSI, O. A., BEESON, L. A., ENGLYST, K., ROMERO, L. F. Effects of exogenous proteases without or with carbohydrases on nutrient digestibility and disappearance of non-Starch polysaccharides in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 94, p. 2662–2669, 2015.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILLE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. SaBios: Ver. **Revista de Saúde e Biologia**. v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

PANESAR, P. S. *et al.* Bioprocessamento de resíduos agroindustriais para produção de enzimas de qualidade alimentar: progresso e perspectivas. **Applied Food Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 208-227, 2016.

PATRA, A.K., S. AMASHEH, and J. R. ASCHENBACH. Modulation of gastrointestinal barrier and nutrient transport function in farm animals by natural plant bioactive compounds: a comprehensive review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, p. 3237 – 3266, 2019.

PELUCIO, M. C. G., & BATISTA, E. S. **Nutrição básica e metabolismo**. Editora UFV. (2008).

PHILIPPS-WIEMANN, P. Enzymes in Human and Animal Nutrition. In: **Proteases general aspects**. p. 257–266, 2018.

POLMANN, G. *et al.* Non-conventional nuts: An overview of reported composition and bioactivity and new approaches for its consumption and valorization of co-products, **Future Foods**, v. 4, 2021.

RAWLINGS, N. D. Protease Families, Evolution and Mechanism of Action. In **Proteases: Structure and Function**, 1st ed.; Brix, K., Stöcker, W., Eds.; Springer-Verlag Wien: Vienna, Austria, 2013.

RAWLINGS, N. D.; Barrett, A. J.; Bateman, A. Using the MEROPS Database for Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors and Substrates. **Current Protocols in Bioinformatics**. 2014, v. 48, n.1, 1.25.1–1.25.33. 2014.

RATH, P. K. *et al.* Amelioration of Heat Stress for Poultry Welfare: A Strategic Approach. **International Journal of Livestock Rresearch**, v. 5, n. 3, p. 1 – 9, 2015. <https://doi.org/10.5455/ijlr.20150330093915>

RIBEIRO, F. S. C.; SOUZA, V. A. B.; LOPES, A. C. A. Physical characteristics and chemical-nutritional composition of the castanheira-do-gurgueia fruit (*Dipteryx lacunifera* Ducke). **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, p. 301-311, 2012.

RIBEIRO, F. S. de C., SOUZA, V.A.B. de, LOPES, A.C.A. Diversidade genética em castanheira-do-gurgueia (*Dipteryx lacunifera* Ducke) com base em características físicas e químico-nutricionais do fruto. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, p. 190-199, 2012.

RIGO, D., *et al.* Microbiological Production of Enzymes: a Review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, p. 9232-9254, 2021.

RODRIGUES, L. S. *et al.* Gerenciamento de resíduos sólidos agrossilvipastoris e agroindustriais. Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia (**Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**), n. 68, 2013.

RORIZ, R. F. C. **Aproveitamento dos Resíduos Alimentícios Obtidos das Centrais de Abastecimento do Estado de Goiás S/A para Alimentação Humana**. 2012, 158 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos. Goiânia – Goiás, Brasil, 2012.

ROSTAGNO, H.S. *et al.* **Tabelas brasileiras para aves e suínos (composição de alimentos e exigências nutricionais)**. 3a ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. p. 77-80.

SABU, A., NAMPOOTHIRI, M., PANDEY, A. L-Glutaminase as a therapeutic enzyme of microbial origin. **Humana Press**, v.17, p. 75-90, 2005.

SADH, P. K., DUHAN, S., DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresour. Bioprocess.** v. 5, n. 1, 2018. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>.

SALAMI, S. A. *et al.* Sustainability of feeding plant by-products: a review of the implications for ruminant meat production. **Animal Feed Science and Technology**, v.251, p.37–55, 2019.

SANTOS, S. K. A. D. **Exoenzima protease em rações base sorgo grão inteiro ou moído em dietas para frangos de corte e galinhas poedeiras**. 2020. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.

SARODE, G.S, *et al.* Role of proteases in oral carcinogenesis: Insights into the cancer degradome and therapeutic implications. **Oral Oncology Reports**, v. 10, p.100-542, 2024.

SELLAMI, K., COUVERT, A., NASRALLAH, N., MAACHI, R., ABOUSEOUD, M., & AMRANE, A. Peroxidase enzymes as green catalysts for bioremediation and biotechnological applications: A review. **Science of the Total Environment**, 806, 150500. (2022)

SEBASTIÁN, D. *et al.* An Overview of Plant Proteolytic Enzymes. **Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes**. p. 1-19, 2018.

SHI, Z., LI, X. Q., CHOWDHURY, M. A. K., CHEN, J. N., & LENG, X. J. Efeitos da suplementação de protease em dietas peletizadas e extrusadas com baixo teor de farinha de peixe no crescimento, retenção de nutrientes e digestibilidade da carpa gibel, *Carassius auratus gibelio*. **Aquicultura**, 460, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquicultura.2016.03.049>. (2016).

SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Avaliação sensorial de cereais matinais de Castanha do Brasil com mandioca extrusadas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 04, p. 950-955, 2006.

SOUZA, R.C *et al.* **Triagem de hidrolases por metagenômica de solos agrícolas do Norte do Paraná**. Embrapa Soja. João Pessoa, p.1, 2020.

VANDANA, G. D. *et al.* Heat stress and poultry production: impact and amelioration. **International Journal of Biometeorology**, v. 65, p. 163-179, 2021.

VERA, R, *et al.* Características químicas de amêndoas de barueiros (*Dipteryx alata* Vog.) de ocorrência natural no cerrado do estado de Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 112-118, 2009.

VIANA, L. G.; CRUZ, P. S. Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais. In: **Congresso Baiano de Engenharia Sanitária e Ambiental**, IV COBESA, Cruz das Almas – Bahia, Brasil. 2016.

VIEIRA JÚNIOR, G. M.; SILVA, H. R.; BITTENCOURT, T. C.; CHAVES, M. H. Terpenos e ácidos graxos de *Dipterix lacunifera* Ducke. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1658-1662, 2007.

VIEIRA, B. S *et al.* Phytase and protease supplementation for laying hens in peak egg production. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, p. 4285–4294. 2016.

VOGEL, K. **Analytics of enzymes**. Academic Press, p. 441-455, 2018.

WARD, O. P. 3.49 Proteases. In **Comprehensive Biotechnology**, 2nd ed.; Moo-Young, M., Ed.; Academic Press: Burlington, USA, 2011, pp 571–582. DOI: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00222

WOICIECHOWSKI, A. L. *et al.* Lignocellulosic biomass: acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – conventional processing and recent advances. **Bioresource technology**, v. 304, 2020.

WU, J., *et al.* Effects of dietary microbial protease on growth performance, nutrient apparent digestibility, hepatic antioxidant capacity, protease activities and intestinal microflora in juvenile genetically improved farmed tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Reports**, v. 34, 2024.

YAO, YUEZHOU *et al.* Effects of rosemary extract supplementation in feed on growth performance, meat quality, serum biochemistry, antioxidant capacity, and immune function of meat ducks. *Poultry Science*, v. 102, n. 2, p. 102357, 2023.

YANG, MENGXIAO, *et al.* Kinetics of pepsin-induced hydrolysis and the coagulation of milk proteins. **Journal of Dairy Science**. v. 105. 2° ed. p. 990-1003, 2022.

CAPÍTULO 2 - USO DA CASCA DO FRUTO DA CASTANHEIRA DO GURGUÉIA
(Dipteryx lacunifera DUCKE) COMO FONTE DE PROTEASES: EXTRAÇÃO,
PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE E
ESTABILIDADE *IN VITRO* EM RAÇÕES PARA FRANGOS DE CORTE
(Artigo a ser submetido na **Preparative Biochemistry and Biotechnology**)
Qualis B1 – fator de impacto 2,0

USO DA CASCA DO FRUTO DA CASTANHEIRA DO GURGUÉIA (*Dipteryx lacunifera* DUCKE) COMO FONTE DE PROTEASES: EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE E ESTABILIDADE *IN VITRO* EM RAÇÕES PARA FRANGOS DE CORTE

Neurimar Araujo da Silva¹, Glayce Kelly da Costa Silva¹, Luis Filipe Cardozo Pinheiro¹, Edson Rodrigues Costa¹, Tiago de Oliveira Sousa¹, José Pedro Martins Barbosa Filho², Silvokleio da Costa Silva¹, Márcia Paula de Oliveira Farias¹, Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa², Ana Lúcia Figueiredo Porto³, Mauricio de Paula Ferreira Teixeira¹, Thiago Pajeú Nascimento¹

¹*Campus Professora Cinobelina Elvas, Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, Piauí, Brasil.*

²*Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.*

³*Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.*

⁴*Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.*

RESUMO

A castanheira-do-gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke), também chamada de "castanheira de burro" ou "fava de morcego", é nativa do Nordeste brasileiro e conhecida por suas amêndoas. Objetivou-se explorar o potencial biotecnológico da casca do fruto da castanheira do Gurguéia quanto à extração, caracterização, purificação, avaliação da toxicidade e estabilidade de proteases, visando sua aplicação em dietas para frangos de corte. O extrato foi obtido por maceração e extração em tampão fosfato (pH 8), seguido de agitação e centrifugação. As proteases apresentaram atividade de 30,66 U/mL e atividade específica de 66,65 U/mg, com pH ótimo de 11 e temperatura ótima de 50 °C. O Mg^{2+} aumentou a atividade em 11%, enquanto outros íons a reduziram. O extrato mostrou estabilidade total em rações peletizadas e fareladas, sem toxicidade frente a *Artemia salina*. A purificação usou o sistema de duas fases aquosas (PEG/Sal), com melhor resultados para polietilenoglicol de 20.000 g/mol, concentração de 12,5%, pH 6 e 10% de sal, obtendo fator de purificação de 8,6 e recuperação de 204,22%. As enzimas demonstraram estabilidade e características bioquímicas favoráveis, indicando seu potencial como aditivo enzimático para a nutrição animal.

Palavra-chave: resíduos agroindustriais, fava do morcego, enzima proteolítica, nutrição animal.

ABSTRACT

The castanheira-do-gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke), also known as "castanheira de burro" or "fava de morcego," is native to the Brazilian Northeast and is known for its almonds. The aim of this study was to explore the biotechnological potential of the fruit peel of the castanheira do Gurguéia regarding the extraction, characterization, purification, toxicity evaluation, and stability of proteases, with a focus on their application in broiler poultry diets. The extract was obtained by maceration and extraction in phosphate buffer (pH 8), followed by agitation and centrifugation. The proteases exhibited an activity of 30.66 U/mL and a specific activity of 66.65 U/mg, with an optimal pH of 11 and an optimal temperature of 50 °C. Mg^{2+} increased the activity by 11%, while other ions reduced it. The extract showed complete stability in both pelleted and crumbled feeds, with no toxicity to *Artemia salina*. Purification was carried out using a two-phase aqueous system (PEG/Sal), with the best results obtained using polyethylene glycol with a molecular weight of 20,000 g/mol, 12.5% concentration, pH 6, and 10% salt concentration, resulting in a purification factor of 8.6 and a recovery of 204.22%. The enzymes demonstrated stability and favorable biochemical characteristics, indicating their potential as an enzymatic additive for animal nutrition.

Keywords: agricultural residues, bat fruit, proteolytic enzyme, animal nutrition.

1. INTRODUÇÃO

A *Dipteryx lacunifera* Ducke mais conhecida como castanha do Gurguéia ou fava de muçego tem predominância no Cerrado das regiões Norte e Nordeste do Brasil, mais precisamente nos estados do Piauí e Maranhão, onde a castanha é muito apreciada pelos povos nativos. A castanheira do Gurguéia pode atingir de 2 a 13 m de altura e diâmetro de copa de 2 a 19 m (Ribeiro *et al.*, 2012).

O consumo da castanha pode ser de forma in natura ou torrada, podendo ser encontrada em feiras livres (Vieira *et al.*, 2007). Suas amêndoas servem como fonte de alimentos para alguns animais sobretudo em períodos de estiagem como é o caso do gado. (Carvalho *et al.*, 2008). Pesquisas mais aprofundadas precisam ser feitas em relação ao potencial biotecnológico das suas cascas, visto que as mesmas são descartadas.

A adoção de matérias-primas alternativas, provenientes de resíduos agroindustriais, tem ganhado destaque como uma estratégia para diminuir a dependência de ingredientes tradicionais, como grãos e oleaginosas, e os impactos ambientais associados. Essa abordagem vem sendo implementada em diversas regiões do mundo, visando reduzir os custos de produção na pecuária, minimizar o desperdício de nutrientes nos setores agrícola e alimentar, e diminuir os efeitos negativos sobre o meio ambiente (Pinotti *et al.*, 2023). A busca por planos para desenvolver produtos ecologicamente corretos tem crescido significativamente, uma alternativa promissora é a substituição de produtos químicos por biocatalisadores em processos produtivos, contribuindo para a redução do impacto ambiental (DENTI, 2021).

Proteínas são descritas como macromoléculas flexíveis, cujas funções dependem das interações com outras moléculas, sendo afetadas fisiologicamente por qualquer tipo de mudança em sua conformação. Além disso, cada proteína possui uma função e estrutura específica. Quanto à forma, elas estão classificadas em proteínas globulares (solúveis em água), proteínas fibrosas (não solúveis em água), oval e alongada (Silva *et al.*, 2021). Industrialmente as enzimas têm sido amplamente empregadas como substituintes de catalizadores químicos por serem ecologicamente mais benéficas. Essas moléculas biológicas foram pioneiras no manuseio humano, sobretudo no início das produções de vinhos e pães. No âmbito nutricional, enzimas como xilanases, fitases, amilases e proteases são mercantilizadas como auxiliares nutricionais tanto na pecuária quanto em seres humanos tendo foco no melhoramento da saúde e na diminuição do desconforto provocado por intolerâncias a certos alimentos (Vogel, 2018).

As proteases se destacam por ser uma classe que efetuam a ação catalítica sobre as ligações peptídicas (subgrupo 4 das hidrolases) nas proteínas e de acordo com o seu sítio catalítico. Estas moléculas proteicas auxiliam em diversas reações biológicas como no processamento de informações celulares, controle de interações proteína-proteína, produção de moléculas bioativas, incluindo replicação e transcrição do DNA, proliferação e diferenciação celular, remodelação e morfogênese de tecidos (Sarode *et al.*, 2024).

As enzimas proteolíticas podem ser encontradas em fontes vegetais (como papaína e bromelina), animais (como pepsina e tripsina) e microbianas (como queratinase e aminopeptidase) (Fadel *et al.*, 2024; Wu *et al.*, 2024). Na qual esta última, advinda de microrganismos lidera o ranking de aplicações e vem sendo aproveitada na degradação de proteínas de alto valor (Rigo *et al.*, 2021).

Ainda que os seres microscópicos sejam a opção mais viável para a indústria, nas aplicações terapêuticas não se encontra a mesma funcionalidade, devido ao tamanho molecular dos catalisadores que impedem o fluxo dentro das células somáticas, e pelas respostas imunitárias nas células hospedeiras que resistem a introdução da nova enzima. Diante disso, há uma escolha e evolução por métodos de extração, caracterização e purificação de proteases de origem vegetal. Mutlu (2007) apontou que algumas dessas proteases vegetais estão envolvidas no processamento e degradação de proteínas de armazenamento de nutrientes em sementes.

A carência de bibliografia especializada sobre as potencialidades contidas na casca da castanha do Gurguéia, foi o principal motivador desta pesquisa, uma vez que todo o material externo da amêndoa é descartado no meio ambiente por não possuir nenhum valor nutricional conhecido pela população. Diante desse fato, o objetivo do presente trabalho foi de investigar o potencial da casca do fruto da castanheira-do-Gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke) como uma fonte de proteases e possibilitar a extração, purificação e caracterização bioquímica dessas enzimas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal e preparo das soluções de estratos

O material da casca da castanheira do Gurgueia (*Dipteryx lacunifera* Ducke) (SISGEN A6C4007) foi coletada de árvores localizadas no Campus Professora Cinobelina Elvas (CPCE) da Universidade Federal do Piauí na cidade de Bom Jesus no Piauí. Coordenadas geográficas 09° 04' 28" de latitude Sul, 44° 21' 31" de longitude Oeste com altitude média de 277 metros. E para as atividades de extração das soluções fora feitas no laboratório de genética, pertencente

Campus Professora Cinobelina Elvas (CPCE) da Universidade Federal do Piauí na cidade de Bom Jesus no Piauí.

2.2 Preparação do extrato bruto contendo as proteases

As cascas da castanha foram obtidas através da quebra do fruto separando-a da castanha (Figura 1). Posteriormente, as cascas foram brevemente lavadas em água corrente e secas ao sol, em seguida foram quebradas com o auxílio de um moinho de facas (Willey Macro (SL-32) – Solab) até a formação de um pó fino. O pó obtido foi diluído na proporção 10% (p/v) em quatro diferentes tampões para analisar o que melhor poderia promover a extração das proteases presentes. Foram utilizados os seguintes tampões: solução de NaCl 0,15 M, pH 7,0; tampão fosfato de sódio 0,1M em pH 6,0; 7,0 e 8,0. As amostras em seus respectivos tampões foram mantidas sob agitação constante (100 rpm) por diferentes tempos de extração (3, 30, 60 e 120 minutos) em temperatura ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), passado os referidos tempos, as soluções foram centrifugadas a $10.000\times g$ por 15 minutos e os sobrenadantes foram denominados como extratos brutos (EBs) e armazenados em freezer a -20°C , para posteriores análises.

Figura 1 - Casca do fruto da castanheira-do-gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke) obtida pela separação da casca da castanha



Fonte: Arquivo próprio.

2.3 Determinação da atividade proteásica

A determinação da atividade proteásica foi realizada segundo o método de Ginther *et al.* (1979). A atividade proteolítica foi determinada pela junção de 150µL do extrato bruto com 250µL da solução de azocaseína 1% (p/v), preparada em 0,2 M de tampão Tris-HCl pH 7,2 a 25°C por uma 1 hora (foram feitas em duplicatas) . A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). Após a centrifugação a 12.000 xg, uma alíquota de 800µL do sobrenadante foi adicionada em tubos contendo 200µL de hidróxido de sódio (1,8 M), agitada em vórtex e lida à 420 nm em espectrofotômetro. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de enzima que provoca um aumento de 0,1 unidade de absorbância por minuto.

2.4 Quantificação de proteína

A concentração proteica foi determinada de acordo com o método de Bradford *et al.*, (1976). A soro albumina bovina foi utilizada como proteína padrão para desenho e construção de curva de calibração em escala de 0 - 1.000 µg/mL. A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína, ou seja, dividindo a atividade proteásica pela quantificação de mg de proteína presente na amostra.

2.5 Caracterização bioquímica das proteases presentes no extrato bruto

2.5.1 Efeito da temperatura na atividade e sua estabilidade

O efeito da temperatura na atividade proteásica foi avaliado utilizando-se uma mistura de reação contendo o substrato específico, azocazeína 1,0% (p/v) e a solução enzimática, levadas ao banho maria nas temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90°C por 1 hora, seguindo Nascimento *et al.*, 2017. Em cada atividade foram feitas em duplicatas, para posterior determinação da atividade proteásica. Para a determinação da estabilidade térmica, a protease em sua temperatura ótima foi por 120 minutos, retirando-se amostras a cada 15 minutos, para a realização da atividade e acompanhamento da sua estabilidade.

2.5.2 Efeito do pH sobre a atividade e sua estabilidade

O efeito do pH na atividade proteásica foi avaliado pela mistura da solução enzimática com o substrato específico, azocazeína 1,0% (p/v), preparados em soluções tampões 0,2 M com diferentes valores de pH: citrato de sódio (pH 3, 4 e 5); fosfato de sódio (pH 6 e 7); Tris-HCl

(pH 7 e 8) e carbonato-bicarbonato (pH 9 e 10) e Glicina-NaOH (pH 11), logo após foram realizadas as determinações da atividade proteásica. Para a determinação da estabilidade da enzima ao pH, as soluções enzimáticas foram incubadas em seu pH ótimo 1:1 (v/v) à temperatura ambiente (25°C), sendo retiradas amostras a cada 24 horas durante 2 dias para realização da atividade e acompanhamento da sua estabilidade.

2.5.3 Efeito de íons metálicos, inibidores e surfactantes

A atividade da protease foi determinada na presença de íons (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}) misturando 200 μL do extrato bruto com 200 μL das respectivas soluções iônicas, todas em uma concentração de 10 mM, em descanso por 60 minutos em temperatura ambiente (25°C). Da mesma forma, para surfactantes, 200 μL do extrato foram misturados com 200 μL dos seguintes surfactantes: etoxilato de monooleato de sorbitano (Tween 80) e dodecil sulfato de sódio (SDS) por 60 minutos. Soluções contendo 1,0% das substâncias mencionadas foram usadas. Após a incubação, a atividade de protease residual foi medida e os resultados foram expressos como uma porcentagem do teste de controle.

2.6 Ensaio de toxicidade frente aos náuplios de *Artemia salina*

Para a análise de toxicidade foi utilizada a metodologia de (Meyer *et al.*, 1982) adaptada. Os cistos de *Artemia. salinam* foram incubados em água do mar artificial (35 g de sal marinho dissolvidos em 1 litro de água destilada) na concentração de 0,5 mg mL^{-1} . A cultura foi mantida sob aeração e agitação constantes, em uma temperatura entre 26 e 30°C por 48 horas para a eclosão deles. Na primeira hora do processo a iluminação (lâmpadas fluorescentes de 20 W) foi mantida e o pH no período de 48 horas foi verificado e ajustado entre 8 e 9. Após a eclosão dos cistos, 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para tubos contendo água artificial do mar, com as proteases presentes no extrato.

Foi utilizado sulfato de quinidina como controle positivo de toxicidade nas mesmas concentrações e a água do mar artificial como controle negativo. Os náuplios foram incubados por 24 horas, decorrido este período de contato os sobreviventes foram contados. Os dados foram analisados pelo método Probits (Finney, 1962) e expressos como CL50 (concentração letal média) e percentual de mortalidade. Foram consideradas tóxicas as substâncias quando a CL50 for menor que 1000 ppm. Resultados com 100% de mortalidade significam elevada toxicidade e de 0% sem toxicidade, a partir da fórmula: % Morte = (Teste - Controle) x 100.

2.7 Avaliação da atividade proteásica frente a diferentes tipos de rações utilizadas para frangos de corte

Foram utilizadas rações de estágio inicial, crescimento e engorda todos para frangos de corte. O teste de atividade enzimática *in vitro* foi realizado adicionando 1% das referidas rações no substrato da atividade proteásica (azocaseína). O controle foi realizado utilizando água em substituição ao extrato bruto, válido ressaltar que também foi verificado a atividade proteásica das rações sem adição enzimática.

2.8 Pré- Purificação através do sistema de duas fases aquosas (PEG-Sal)

Os parâmetros de extração das proteases estudados foram: massa molar e concentração do Polietilenoglicol (PEG), concentração do sal (fosfato de sódio) e pH, utilizando um planejamento fatorial 2^4 de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Níveis das variáveis estudadas no planejamento fatorial completo 2^4 para purificação da protease extraída da casca da Castanheira do Gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke).

Variáveis	Níveis		
	Baixo (-1)	Central (0)	Alto (+1)
Massa Molar de Polietilenoglicol (g/Mol)	400	10000	20000
Concentração de (PEG) (%)	12,5	15,0	17,5
Concentração de Sal (%)	10,0	12,5	15,0
pH	6	7	8

*PEG- Polietilenoglicol

Os sistemas de duas fases aquosas (SDFA) foram preparados em tubos graduados de 15 mL com forma cônica, contendo as quantidades desejadas de PEG e sal de acordo com a Tabela 1. Posteriormente foi adicionado o extrato bruto enzimático, que correspondeu a 20% (m/m) da massa total do sistema. A água foi adicionada a um valor final de 10 g. Após agitação por vórtex 1 min, as fases foram separadas por decantação por 60 min. Em seguida, os volumes das fases foram mensurados, alíquotas das fases foram retiradas separadamente com pipetas e analisadas para a concentração de proteína e atividade proteásica para posterior cálculos sobre as variáveis respostas: coeficiente de partição (K), fator de purificação (FP) e recuperação enzimático (Y).

O coeficiente de partição da protease (K) foi determinada pela razão entre as atividades da protease na fase superior (F_{PEG}) e na fase inferior (F_{SAL}):

$$K = \frac{FPEG}{FSAL}$$

O fator de purificação (FP) foi definido como a atividade específica da protease presente da fase PEG (AE_{PEG}) ou sal (AE_{SAL}) sobre a atividade específica do extrato bruto (AE_{bruto}):

$$FP = \frac{AEPEG/AESAL}{AEbruto}$$

A recuperação enzimática (Y) foi determinada como a razão da atividade proteásica na fase superior (AP_{PEG}) ou inferior (AP_{SAL}) sobre seu respectivo volume (V_{PEG}) ou (V_{SAL}), tudo isso sobre a atividade proteásica presente no extrato bruto (AP_{bruto}) dividida pelo seu respectivo volume do extrato adicionado no sistema e posteriormente multiplicado por 100 para representação da recuperação em porcentagem:

$$Y = \left(\frac{\frac{APPEG}{VPEG} \text{ ou } \frac{APSAL}{VSAL}}{\frac{APbruto}{Vbruto}} \right) \times 100$$

Após essas análises foi realizado a análise das influências de todas as variáveis (massa molar e concentração do PEG, pH e concentração do sal) sobre a purificação da protease.

2.9 Análise estatística

Os efeitos foram avaliados por uma análise de variância com um nível de significância de 5% para fazer estimativas dos efeitos principais e de segunda ordem um valor linear absoluto dos fatores em relação as variáveis de resposta estudadas. A análise estatística do projeto experimental será realizada usando o software Statística 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração das proteases

De acordo com a Tabela 2 foi possível observar variações na extração das proteases em função dos diferentes tampões e tempos de extração. Foi possível observar que todos os tampões utilizados foram possíveis de se obter a extração das proteases.

Tabela 2 -Atividade de proteases extraídas da casca do fruto da Castanheira-do-Gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke) utilizando diferentes tampões e tempos de extração.

Tampões	Tempos (minutos)	Atividade (U/mL)	Proteína (mg)	Atividade específica (U/mg)
NaCl (0,15M)	3	7,06	0,24	29,41
	30	10,20	0,29	35,17
	60	8,16	0,23	35,47
	120	9,53	0,24	39,70
Fosfato de sódio monobásico (0,1M)	3	4,90	0,23	21,30
	30	14,30	0,26	17,05
	60	10,23	0,60	34,10
	120	12,36	0,80	15,45
Fosfato de sódio bibásico (0,1M)	3	5,03	0,46	10,96
	30	6,90	0,46	15,00
	60	15,60	0,48	32,50
	120	30,66	0,46	66,65
Fosfato de sódio pH 7,0	3	5,90	0,49	12,04
	30	8,30	0,70	11,85
	60	6,76	0,70	7,46
	120	5,40	0,33	16,36

Para o NaCl 0,15 M, a maior atividade enzimática e concentração de proteína foram observadas aos 30 minutos de extração, com valores de 10,20 U/mL e 0,29 mg, respectivamente. No entanto, a atividade específica da enzima aumentou com tempos de extração mais longos, destacando-se aos 120 minutos, com 39,70 U/mg. Com relação aos tampões fosfato de sódio em diferentes pHs, houve grande diferença entre eles obtendo atividade proteásica variando de 6,76 U/mL a 30,66 U/mL.

De todas as soluções utilizadas a que promoveu a melhor extração foi o tampão fosfato de sódio bibásico (0,1M) em um tempo de extração de 120 minutos, que obteve 30,66 U/mL e uma atividade específica de 66,65 U/mg. Diante disso, torna-se necessário realizar ensaios para otimizar a produção e purificação da enzima, considerando que a estabilidade é um dos principais fatores a serem avaliados na seleção de enzimas para aplicações industriais.

3.2 Caracterização bioquímica das proteases presentes no extrato bruto

Com relação a caracterização bioquímica do extrato bruto verificou-se que a temperatura ideal para a atividade da protease extraída da casca do fruto da castanheira-do-gurguéia foi de 50 °C, alcançando uma atividade de 22,0 U/mL (Tabela 3). Segundo Sousa (2020) a faixa considerada ótima de temperatura para a hidrólise enzimática é entre 40 °C e 55 °C, utilizada na maioria dos estudos onde deve-se observar se a enzima utilizada tem atividade

na temperatura escolhida. A prensagem convencional e a extração com solventes envolvem altas temperaturas (70 a 90 °C), o que reduz a qualidade e a solubilidade das proteínas, sendo então uma vantagem o uso de temperaturas mais brandas (Fetzera *et al.*, 2018).

Tabela 3 – Avaliação da atividade ótima das proteases extraídas da casca do fruto da castanheira-do-Gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke).

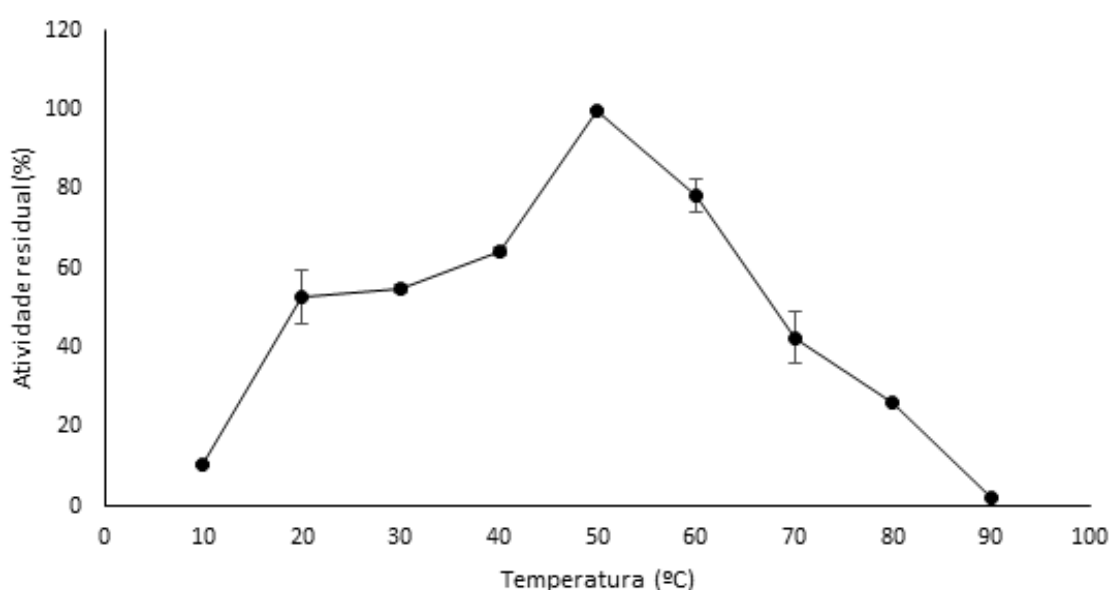
Temperaturas (°C)	Protease (U/mL)
10	2,33
20	11,66
30	12,06
40	14,16
50	22,00
60	17,23
70	9,36
80	5,76
90	0,46

No processo digestivo dos frangos de corte, as proteases desempenham um papel essencial na quebra das proteínas ingeridas, convertendo-as em aminoácidos e peptídeos menores que podem ser absorvidos pelo trato gastrointestinal. A estabilidade das proteases no trato digestivo é fundamental para essa eficiência. A maioria dessas enzimas apresenta uma estabilidade ideal em temperaturas que variam de 40 a 50°C, faixa que se aproxima da temperatura interna do corpo dos frangos de corte, que geralmente fica em torno de 41-42 °C. Dentro desse intervalo de temperatura, as proteases como a pepsina e a tripsina mantêm sua atividade máxima, permitindo uma digestão eficaz das proteínas alimentares. A consistência dessa temperatura interna assegura que as enzimas digestivas permaneçam ativas durante o processo de digestão, facilitando a absorção dos nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento dos frangos.

Ao analisar a atividade da protease na figura 2 pôde-se observar um aumento gradual até a temperatura de 50 °C, atingindo sua produção máxima de protease (100%). A uma temperatura de 60°C, a enzima manteve sua atividade de aproximadamente 80%. Contudo, com o aumento contínuo da temperatura, observou-se uma redução drástica na atividade enzimática,

alcançando os menores níveis a 90 °C. Dambar *et al.* (2024) observaram em seu estudo que a faixa ótima de temperatura da protease extraída *Kinema* está entre 40 e 60°C mas passou a diminuir gradualmente após esse ponto, e sua estabilidade também variou de 30 °C e 40°C. Esses resultados sugerem que a faixa ideal para a atividade da protease situa-se entre 40 °C e 50 °C, alinhando-se aos dados da Castanheira do Gurguéia dentro da normalidade das condições térmicas.

Figura 2 – Atividade residual de proteases extraídas da casca do fruto da castanheira-do-gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke) frente a diferentes temperaturas.



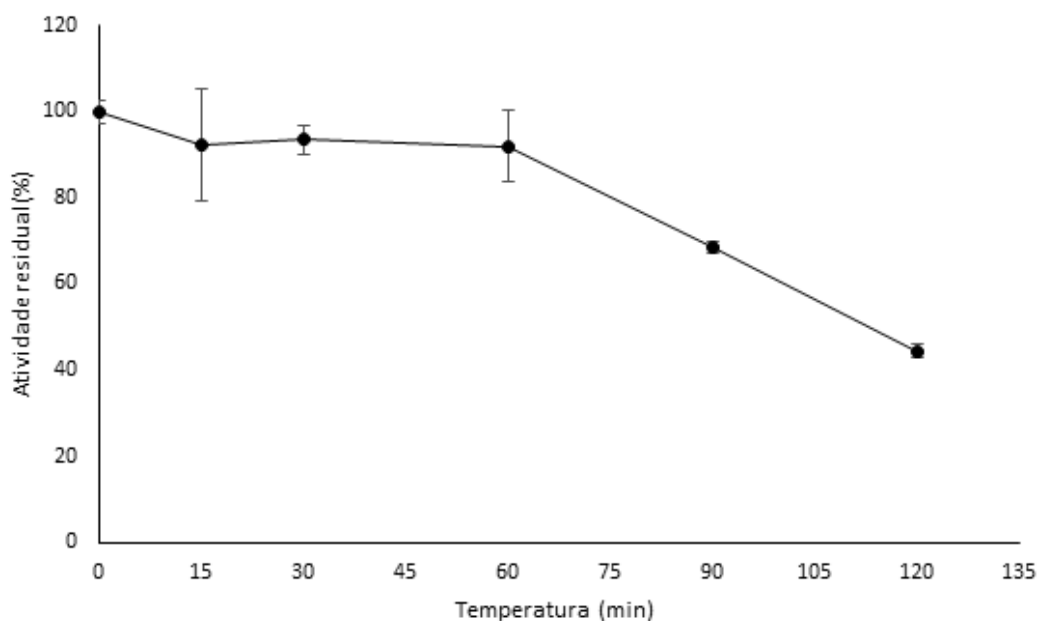
Ao analisar o tempo de estabilidade ideal da atividade da protease (Tabela 4), observaram-se maiores atividades enzimáticas até os 30 minutos, com atividade de 28,86 U/mL.

Tabela 4 - Caracterização da atividade de proteases extraídas da casca do fruto da castanheira-do-Gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke) frente a diferentes tempos.

Tempo (min)	Protease (U/mL)
0	30,86
15	28,46
30	28,86
60	28,40
90	21,13
120	13,70

A estabilidade da enzima é um fator crucial para sua aplicação industrial. A enzima extraída da castanheira-do-gurguéia quando submetida a temperatura de 50 °C, apresentou atividade de 80% por um tempo de 60 minutos, acima de 60% de atividade em um tempo de 90 minutos e mais de 40% por um tempo de 120 minutos (Figura 3).

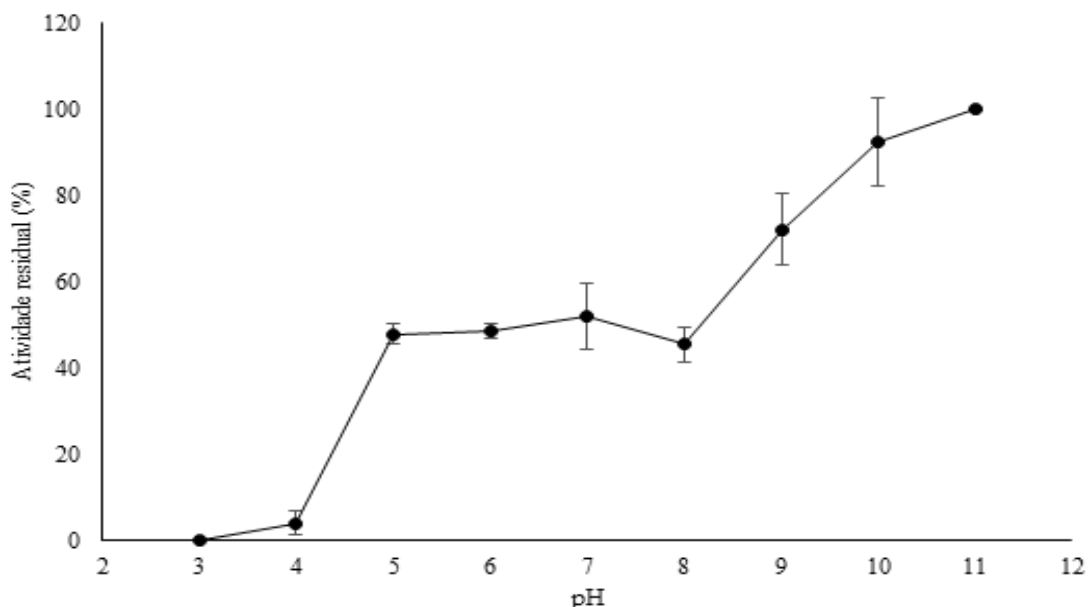
Figura 3 – Efeito do tempo na estabilidade da protease extraída da casca do fruto da castanheira-do-Gurguéia a 50°C.



Com base nesses resultados, é possível definir um período ideal de uso para minimizar perdas de atividade enzimática decorrentes de alterações em suas propriedades. Machado *et al.* (2017) verificaram que as enzimas proteolíticas de *P. ostreatoroseus* se mantiveram estáveis entre as faixas de temperaturas 25 a 50 °C. Magalhães *et al.* (2019) obtiveram resultados semelhantes a atividade ótima a 50°C em enzimas proteolíticas produzidas por *L. crinitus*, tanto em cultivo submerso, como em substrato sólido, bem como para os cogumelos *P. ostreatoroseus* e *P. citrinopileatus* que também apresentaram temperatura ótima de suas proteases a 50 °C (Cui *et al.*, 2007; Silva, 2015).

A influência do pH na atividade das proteases extraídas da casca do fruto da *D. lacunifera* Ducke é apresentada na (Figura 4). Observou-se que as enzimas praticamente não apresentam atividade em pH abaixo de 4,0, diminuindo a tolerância a meios muito ácidos. No entanto, houve estabilidade entre pH 5,0 e 8,0, com atividade em torno de 50%. À medida que o pH se tornou mais alcalino, a atividade enzimática aumentou, alcançando 100% de atividade em pH 11,0.

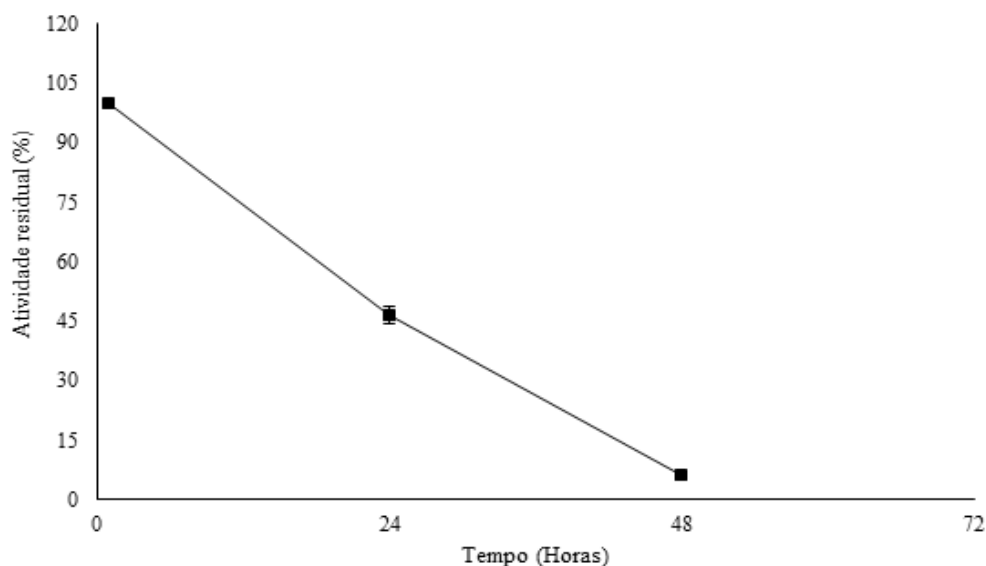
Figura 4 - Efeito do pH na estabilidade da protease extraídas da casca do fruto da *D. lacunifera* Ducke.



De acordo com esses resultados, podemos classificar a protease extraída da casca do fruto da *D. lacunifera* Ducke como alcalina. Essa ampla tolerância permite que a enzima atue em uma grande faixa de pH. As proteases alcalinas, que apresentam atividade máxima em pH entre 8,0 e 13,0, são amplamente utilizadas como aditivos na indústria de detergentes. Essas enzimas se destacam pela eficácia na remoção de manchas proteicas, demonstrando alta estabilidade em condições de pH elevado, ampla tolerância térmica e compatibilidade com outros componentes presentes nas formulações de detergentes (Ractz, 2015; Intelligence, 2021; Tanwar *et al.*, 2022).

Ao avaliar a estabilidade da enzima em pH 11,0 (Figura 5), verificou-se uma redução da atividade enzimática, após 24 horas de exposição, a atividade caiu para cerca de 45% do valor inicial, e após 48 horas, reduziu-se para níveis abaixo de 15%.

Figura 5 - Efeito do tempo na estabilidade da protease extraída da casca do fruto da *D. lacunifera* Ducke em pH 11,0.



O estudo também investigou o efeito de diferentes íons na atividade das proteases extraídas da casca do fruto da *D. lacunifera* Ducke (Tabela 5). Os resultados revelaram que o íon magnésio (Mg^{2+}) aumentou a atividade enzimática em 11%. Babalola *et al.*, 2023 caracterizando uma protease obtida das folhas de mamão papaya (*Carica papaya*) e utilizando diferentes íons também teve a atividade enzimática aumentada apenas na presença de Mg^{2+} . Segundo Li *et al.*, 2013, os íons podem funcionar como ponte iônica para preservar a integridade da estrutura ou estabilizar o complexo enzima-substrato, prevenindo a autólise e o desdobramento térmico. Já o íon sódio (Na^+) e o dodecil sulfato de sódio (SDS) reduziram a atividade em 17% e 31%, respectivamente. Outros íons apresentaram influência mínima, com reduções inferiores a 9%.

Tabela 5 - Efeito dos íons e surfactantes na atividade da protease extraída da casca do fruto da *D. lacunifera* Ducke.

Íons	Atividade proteásica (U/mL)	Atividade residual (%)
Controle	14,36	100,0
Na^+	11,93	83,0
K^+	13,13	91,0
Mg^{2+}	16,00	111,0
Ca^{2+}	13,36	93,0
Surfactantes	Atividade proteásica (U/mL)	Atividade residual (%)

Controle	14,36	100,0
SDS	9,86	69,0
Tween 80	13,63	95,0

* SDS- Dodecil Sulfato de Sódio

3.3 Avaliação da toxicidade das proteases presentes no extrato bruto frente aos náuplios de *Artemia salina*

O extrato bruto obtido da casca do fruto de *D. lacunifera* foi avaliado quanto à toxicidade utilizando *Artemia salina* como organismo modelo, e os resultados não indicaram qualquer efeito tóxico. A ausência de toxicidade frente a *A. salina* é um indicativo de segurança do extrato, sugerindo que ele não apresenta compostos com propriedades tóxicas em nenhuma concentração, o que amplia seu potencial para futuras aplicações.

3.4 Avaliação da atividade proteásica frente a diferentes tipos de rações utilizadas para frangos de corte

Dentre todas as rações testadas, apenas o milho e a ração de engorda obtiveram estabilidade da atividade proteásica da enzima, tendo respectivamente: 2,66 e 1,76 unidades por mL, a ração do tipo inicial e a ração de crescimento não promoveram estabilidade da enzima. O efeito benéfico da protease na saúde intestinal pode ser uma combinação de vários fatores que se interagem. Tais fatores inclui uma redução na fermentação da proteína no intestino grosso e a hidrólise de fatores antinutricionais que poderia dificultar a absorção dos nutrientes presentes na ração bem como proteínas antigênicas. Nesse sentido foi possível observar que as proteases presente no extrato bruto da casca do fruto da *D. lacunifera* Ducke possui estabilidade frente a rações do tipo inicial e de milho, podendo posteriormente ser utilizada como um aditivo enzimático, trazendo benefícios a saúde do animal e redução nos custos de produção, sobretudo nessa fase inicial de alimentação dos frangos, que deve ser fornecida aos pintos até oito semanas de idade.

3.5 Purificação das proteases presentes no extrato bruto pelo Sistema de Duas Fases Aquosas (PEG/Fosfato de sódio)

Com relação ao processo de purificação por SDFA podemos observar através da Tabela 6 que 8 ensaios não formaram fase, ou seja nesses ensaios houve uma incompatibilidade termodinâmica, resultando em um sistema homogêneo. Isso pode acontecer por diversos motivos: Compatibilidade Molecular, ou seja, se os componentes do sistema possuem alta afinidade intermolecular (como interações hidrofílicas semelhantes ou ligações de hidrogênio

entre as moléculas), eles podem permanecer miscíveis em vez de se separarem em fases distintas.

Tabela 6 - Resultados da purificação da protease extraída do fruto da Castanheira do Gurguéia pelo SDFA (PEG/fosfato de sódio).

Ensaio	Massa Molar do PEG	Concentração do PEG (%)	Concentração do Sal (%)	pH	Atividade Proteásica (U/mL) PEG	Atividade Proteásica (U/mL) SAL	K	Y _{PEG}	Y _{sal}	FP _{PEG}	FP _{Sal}
1	400	12,5	10	6		Não formou fase					
2	20000	12,5	10	6	1,8	5,4	0,36	44,36	204,22	0,99	8,6
3	400	17,5	10	6		Não formou fase					
4	20000	17,5	10	6	0,7	2,73	0,25	25,63	69,21	0,38	4,79
5	400	12,5	10	8		Não formou fase					
6	20000	12,5	10	8	2,16	3,56	0,6	60,84	125,35	0,94	4,62
7	400	17,5	10	8		Não formou fase					
8	20000	17,5	10	8	1,5	0,26	5,76	42,25	8,78	0,63	0,38
9	400	12,5	15	6		Não formou fase					
10	20000	12,5	15	6	2,86	4,44	0,65	74,52	164,22	1,4	6,65
11	400	17,5	15	6		Não formou fase					
12	20000	17,5	15	6	3,13	4,4	0,71	119,02	111,54	1,73	4,08
13	400	12,5	15	8		Não formou fase					
14	20000	12,5	15	8	0,93	3,36	0,27	18,99	120,67	0,46	4,15
15	400	17,5	15	8		Não formou fase					
16	20000	17,5	15	8	2,7	3,7	0,72	76,05	130,28	2,04	4,66
17 ^C	10000	15	12,5	7	2,9	3,1	0,54	81,69	109,15	1,12	4,24
18 ^C	10000	15	12,5	7	4,26	2,43	0,75	123	87,27	2,86	2,52
19 ^C	10000	15	12,5	7	2,9	3,1	0,93	81,69	109,15	1,12	4,24
20 ^C	10000	15	12,5	7	2,2	4,06	0,54	60,42	87,25	0,95	4,5

MM_{PEG} = Massa molar do PEGC_{PEG} = Concentração do PE

pH = Potencial hidrogeniônico

C_{sal} = Concentração de fosfato

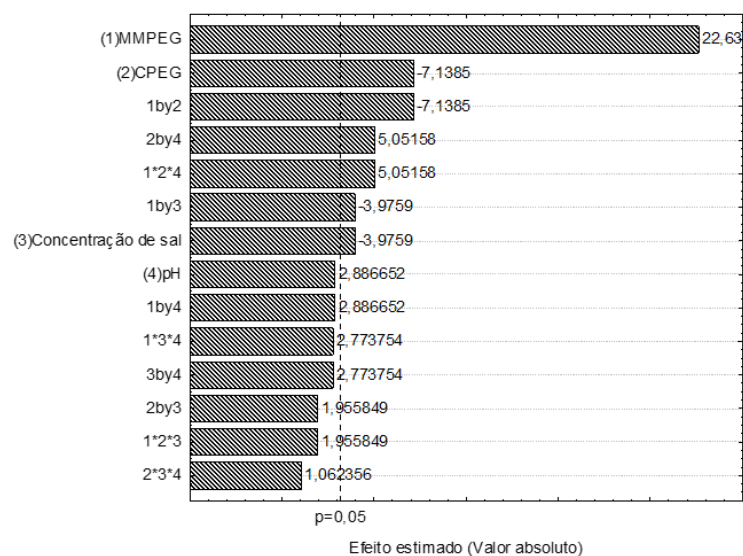
K = Fator de partição

Y_{PEG} = Recuperação da enzima no PEGY_{SAL} = Recuperação da enzima no SALFP_{PEG} = Fator de purificação do PEGFP_{SAL} = Fator de purificação do SalC= Ponto central
negrito=melhor ensaio

Para a formação de fases, os componentes devem estar presentes em concentrações acima de um limite crítico. Concentrações muito baixas de polímeros ou sal podem resultar em uma solução homogênea, sem separação de fases. Temperatura Inadequada: A temperatura pode afetar a solubilidade dos componentes. Em algumas condições, temperaturas fora do intervalo ideal podem impedir a separação de fases. pH ou Força Iônica Inadequados: A formação de fases pode depender do equilíbrio eletroquímico entre os componentes. Se o pH ou a força iônica não forem adequados, a separação pode não ocorrer. Interferências Adicionais: Presença de aditivos, contaminantes ou outros solutos que alterem as propriedades termodinâmicas do sistema, promovendo miscibilidade em vez de separação. É válido ressaltar que esses fatores podem ser controlados para ajustar as condições e promover ou inibir a formação de fases, dependendo da aplicação desejada.

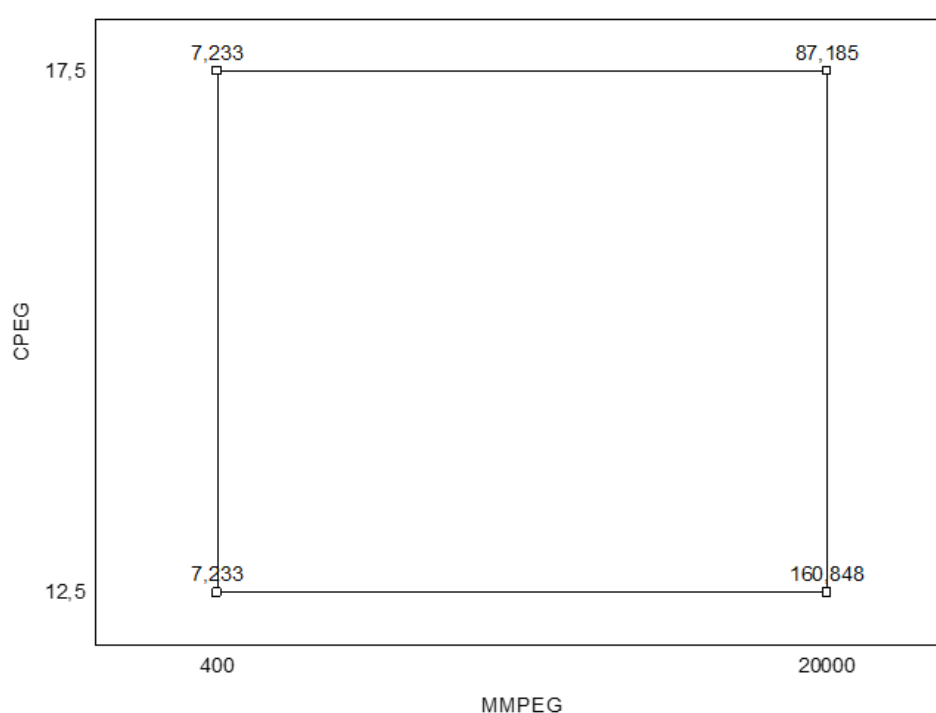
Dessa forma apenas 12 ensaios houve a formação de fases, dentre esses ensaios as proteases apresentaram preferência pela solução salina, ou seja, um coeficiente de partição (K) abaixo de 1. Apenas 1 ensaio teve a protease migrada para fase PEG ($K > 1$) que foi o ensaio 8. A figura 6 apresenta os resultados da análise da influência das variáveis MM_{PEG} , C_{PEG} , pH e C_{Sal} sobre o K da protease extraída da casca do fruto da *D. lacunifera* Ducke. Destas variáveis, apenas a MM_{PEG} teve um efeito significativo na partição da enzima, sendo esse efeito positivo, ou seja, quanto maior a MM_{PEG} , mais eficiente é o processo de partição das proteases para a fase rica em sal. Isso ocorre devido a exclusão preferencial por efeito de volume excluído, onde a maior massa molar do PEG que tem um maior tamanho molecular, ocupa mais espaço na solução.

Figura 6 – Efeitos das variáveis independentes (MM_{PEG} , C_{PEG} , pH, C_{Sal}) na recuperação da enzima no SAL (Y_{sal}).



A Figura 7 apresenta uma interpretação da interação dos efeitos de C_{PEG} e MM_{PEG} na recuperação das proteases para a fase sal, verifica-se que o efeito da concentração do PEG é mais evidente quando o nível da massa molar de PEG é mais alto. Portanto, a recuperação ótima da enzima na fase sal ocorre sob as seguintes condições: baixa concentração de C_{PEG} e alta massa molar de MM_{PEG} , especificamente 12,5% e 20.000 g/mol, respectivamente.

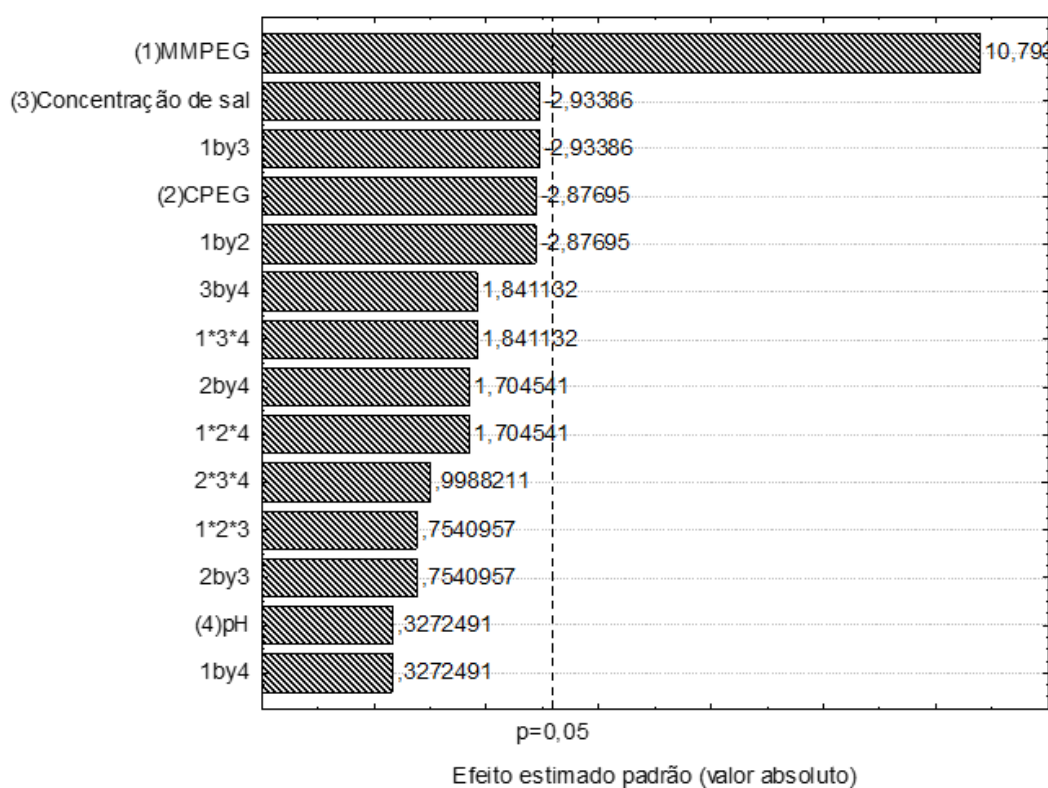
Figura 7 – Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos de um planejamento 2^4 , tendo como variável-resposta a recuperação das proteases para a fase sal (Y_{sal}) para analisar a concentração do PEG em função da massa molar do PEG.



Dentro todos os ensaios analisados o que apresentou as melhores condições para a extração da protease contida no extrato bruto e purificada pelo SDFA foi o ensaio 2 que apresentou uma MM_{PEG} de 20.000 g/Mol, uma C_{PEG} de 12,5%, pH 6 e uma C_{Sal} de 10%, essas condições promoveram uma partição da enzima para a fase rica em sal ($K = 0,36$), com uma atividade proteásica na respectiva fase de 5,4 U/mL, uma recuperação de 204,22% e um FP_{Sal} de 8,6.

A análise da Figura 8 revela que o fator de purificação da protease na fase rica em sal (FP_{Sal}) é significativamente influenciado pela massa molar do PEG (MM_{PEG}). Especificamente, quanto maior a massa molar do PEG, maior o fator de purificação da protease na fase rica em sal, sendo também a única variável estatisticamente significativa.

Figura 8 - Efeito das variáveis sobre o fator de purificação (FP_{SAL}) da protease extraída da casca do fruto da castanheira do-Gurguéia pelo sistema de duas fases aquosas na fase rica em sal. (FP_{SAL})



4. CONCLUSÃO

Conclui-se que foi possível extrair e caracterizar proteases a partir da casca do fruto de *Dypetrix lacunifera* Ducke, destacando o potencial biotecnológico deste material, que seria descartado como resíduo. As enzimas presentes no extrato bruto, caracterizadas bioquimicamente quanto ao pH, temperatura, estabilidade frente a íons e surfactantes, apresentaram resultados promissores. Além disso, a ausência de toxicidade para *Artemia salina* confirma a segurança do extrato, enquanto sua estabilidade em rações para frangos de corte sugere viabilidade para aplicação na nutrição animal. A purificação das enzimas por sistemas de duas fases aquosas demonstrou a eficácia desse método e ressaltou o potencial de aproveitamento sustentável da casca do fruto como um aditivo alimentar, contribuindo para a valorização de resíduos e promovendo o desenvolvimento de soluções ecológicas na agroindústria. Dessa forma, o estudo abre novas perspectivas para a utilização de resíduos agroindustriais, alinhando sustentabilidade e inovação no setor.

REFERÊNCIAS

- BABALOLA, B. *et al.* Extraction, purification and characterization of papain cysteine-proteases from the leaves of *Carica papaya*. **Scientific African**, v. 19, p. 2023. e01538 C.
- BENMRAD, O. M. *et al.* Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest. **BMC Biotechnol** 19, 43, 2019.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 7; n. 7, p. 248-54, 1976. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3. PMID: 942051.
- CUI, L *et al.* An alkaline protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 81-85, 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-006-0801-z>
- DAMBAR, B. *et al.* Partial purification and characterization of protease extracted from kinema, **Heliyon**, 10, 5.
- DENTI, A. F. *et al.* Enzimas e suas aplicações com ênfase na indústria de alimentos. **Revista Perspectiva**, v. 46, n. 175, p. 51-68, 2022. Disponível em <https://repositorio.cruzeirodosul.edu.br/handle/123456789/3521>. Acesso em: 29/ Nov/2024
- FADEL, H. H. Mohamed et al. Bioprodução de novas proteases e sabores de processo a partir de resíduos agroindustriais. **Medição: Alimentação**, v. 14, p. 100160, 2024.
- FETZER, A. *et al.* Influence of process conditions during aqueous protein extraction upon yield from pre-pressed and cold-pressed rapeseed press cake. **Industrial Crops and Products**. v. 112, p. 236–246, fev. 2018.
- FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. Cambridge, Cambridge University Press, 1962.
- GINTHER, C. L., 1979. Sporulation and the production of serine protease and cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15, 522-526
- INTELLIGENCE, Mordor. Proteases Market - Growth, Trends, Covid-19 Impact, and Forecasts (2022-2027). <https://Www.Mordorintelligence.Com/IndustryReports/Smart-Railways-Market>. Available at: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-wearable-medical-device> market-industry. 2021.

LI, Q. *et al.* Commercial proteases: present and future, **FEBS Lett.** v. 587, n. 8, p. 1155–1163, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.12.019>.

LITWACK, G. Enzymes. In. LITWACK, Gerald. **Human Biochemistry**. Academic Press, p. 95-129, 2018.

MACHADO, A.R.G. *et al.* Production and characterization of proteases from edible mushrooms cultivated on amazonic tubers. **African Journal of Biotechnology**. v.16, n.46, p. 2160-2166, 2017.

MAGALHÃES, A. A. S. *et al.* Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (Polyporaceae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais**, v. 14, n. 3, p. 453-461, 2019.

MEYER, B. N. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.** May, v. 45(5), p. 31-34, 1982 doi: 10.1055/s-2007-971236. PMID: 17396775.

MUTLU, A., *et al.* The aspartic proteinase is expressed in *Arabidopsis thaliana* seeds and localized in the protein bodies. **Seed Science Research**. v-8. p 75 – 84. February. 2007.

NAVEED, M., *et al.* Protease A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. **Catalysis Letters**. v. 151. p. 307-323, 2021.

PINOTTI, Luciano *et al.* Reduce, reuse, recycle for food waste: A second life for fresh-cut leafy salad crops in animal diets. **Animals**, v. 10, n. 6, p. 1082, 2023.

RACZ, J. V. B. **Produção e aplicação de proteases dos fungos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger***. monografia. 2015. 65 f. Monografia -Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

RIBEIRO, F. S. C.; SOUZA, V. A. B.; LOPES, A. C. A. Physical characteristics and chemical-nutritional composition of the castanheira-do-gurguéia fruit (*Dipteryx lacunifera* Ducke). **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, p. 301-311, 2012.

RIGO, D., *et al.* Microbiological Production of Enzymes: a Review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, p. 9232-9254, 2021.

SABU, A., NAMPOOTHIRI, M., PANDEY, A. L-Glutaminase as a therapeutic enzyme of microbial origin. **Humana Press**, v.17, p. 75-90, 2005.

SARODE, G.S, *et al.* Role of proteases in oral carcinogenesis: Insights into the cancer degradome and therapeutic implications. **Oral Oncology Reports**, v. 10, p.100-542, 2024.

SILVA, L. X.; BASTOS, L. L.; SANTOS, L. H. Modelagem computacional de proteínas. **Revista Brasileira de Bioinformática**, v. 20, 2021.

SOUZA, T. S. P. **Extração verde de torta de amêndoa: otimização, estudo em escala piloto e caracterização da fração proteica.**Tese. 2020.

STATSOFT, INC. Statistica for Windows (Data Analysis Software System), Version 8.0. 298 p. Computer Program Manual, Quick Reference. Statsoft. Inc., Tulsa, 2008.

TANWAR, M. *et al.* Exploring the utility of nanoprotease as environmentally friendly benign laundry detergent fabric cleaner. **Journal of Cleaner Production**, v. 334, p. 130243, 2022.

VOGEL, K. **Analytics of enzymes.** Academic Press, p. 441-455, 2018.

WU, J., *et al.* Effects of dietary microbial protease on growth performance, nutrient apparent digestibility, hepatic antioxidant capacity, protease activities and intestinal microflora in juvenile genetically improved farmed tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Reports**, v. 34, 2024.

CAPÍTULO 3 – APLICAÇÃO DE PROTEASES BRUTAS E PURIFICADAS OBTIDAS DA CASCA DO FRUTO DA *DIPTERYX LACUNIFERA* DUCKE COMO ADITIVO EM DIETA PARA PINTOS DE CORTE EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE TÉRMICO
(Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia)

APLICAÇÃO DE PROTEASES BRUTAS E PURIFICADAS OBTIDAS DA CASCA DO FRUTO DA *DIPTERYX LACUNIFERA* DUCKE COMO ADITIVO EM DIETA PARA PINTOS DE CORTE EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE TÉRMICO

Neurimar Araujo da Silva¹, Mylena Rocha Messias¹, Glayce Kelly da Costa Silva¹, Luis Filipe Cardozo Pinheiro¹, Edson Rodrigues Costa¹, Tiago de Oliveira Sousa¹, Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa², Ana Lúcia Figueiredo Porto³, Stélio Bezerra Pinheiro de Lima, Mauricio de Paula Ferreira Teixeira¹, Thiago Pajeú Nascimento¹

¹*Laboratório de Genética-Campus Professora Cinobelina Elvas, Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, Piauí, Brasil.*

²*Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.*

³*Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil.*

RESUMO

A avicultura de corte possui atividade econômica importante para o Brasil, mas enfrenta desafios significativos, como o estresse térmico, que impacta o bem-estar das aves e gera perdas financeiras. Por serem animais homeotérmicos, têm dificuldade em regular sua temperatura corporal em condições de calor extremo, resultando em efeitos adversos. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da adição de proteases brutas e purificadas da casca da castanheira-do-Gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke) na dieta de pintos de corte durante a fase de 1 a 7 dias de idade sob condições de estresse térmico. Foram utilizados 150 pintos da linhagem Cobb, distribuídos em um experimento totalmente casualizado, com três tratamentos: um grupo controle sem adição de enzima a ração, outro com 300 unidades/g de ração contendo enzima do extrato bruto (equivalente a 2,1 g/kg de ração), e para o purificado (6,6 g/kg de ração) com 5 repetições com 10 aves em cada gaiola. Os resultados mostraram que as condições experimentais apresentaram estresse térmico, com índices de temperatura acima do ideal para o conforto das aves na primeira semana. No entanto, no 7º dia, os pintos que receberam o extrato purificado apresentaram um peso final significativamente maior em comparação extrato bruto e ao grupo controle, indicando um ganho bom desempenho no ganho de peso. Assim, conclui-se que a casca da *Dipteryx lacunifera* Ducke é uma alternativa promissora para suplementação na dieta de frangos de corte, melhorando parâmetros produtivos como ganho de peso e conversão alimentar, mesmo em condições severas de estresse térmico. É importante, no entanto, combinar essa estratégia nutricional com medidas ambientais para reduzir os efeitos do estresse térmico.

Palavras chaves: enzimas proteolíticas, estresse por calor, nutrição animal, frangos de corte.

ABSTRACT

Aviculture has an important economic activity for Brazil, but faces significant challenges such as thermal stress that impacts the well-being of birds and generates financial losses. Because they are homeothermic animals, they have difficulty regulating their body temperature under extreme heat conditions, resulting in adverse effects. This study aimed to evaluate the effects of the addition of gross and purified proteases of the casca of the gurge chestnut (*Dipteryx lacunifera* Ducke) in the diet of cutting chicks during the phase of 1 to 7 days of age under conditions of thermal stress. 150 chicks of the Cobb lineage were used, distributed in a fully randomized experiment, with three treatments: a control group without enzyme added to feed, another with 300 units/g of ration containing gross extract enzyme (equivalent to 2.1 g/ kg of feed), and for the purified (6.6 g/kg of feed) with 5 repetitions with 10 birds in each cage. The results showed that experimental conditions had thermal stress, with temperature rates above the ideal for bird comfort in the first week. However, on day 7, the chicks that received the purified extract had a significantly higher final weight compared to gross extract and the control group, indicating a good performance in weight gain. Thus, it is concluded that *D. lacunifera* bark is a promising alternative for supplementation in the broiler diet, improving productive parameters such as weight gain and food conversion, even under severe thermal stress conditions. It is important, however, to combine this nutritional strategy with environmental measures to reduce the effects of thermal stress.

Keywords: proteolytic enzymes, heat stress, animal nutrition, chickens.

1. INTRODUÇÃO

O estresse por calor representa um dos maiores desafios na avicultura, afetando qualidades o bem-estar das aves e gerando perdas econômicas consideráveis. Esse problema é especialmente crítico em linhagens modernas de frangos de corte, cujas altas taxas metabólicas os tornam mais vulneráveis a temperaturas elevadas (Cahaner, 2003). As consequências incluem redução do consumo de ração, menor taxa de crescimento, comprometimento do sistema imunológico e aumento da mortalidade, destacando a necessidade de implementação de estratégias de prevenção (Liu et al., 2020).

Suplementação a base de aditivos extraídos de vegetais tem se destacado como uma alternativa promissora no manejo do estresse térmico em frangos de corte. Os compostos bioativos presentes nesses extratos mostram potencial para melhorar a digestibilidade dos nutrientes, fortalecer o sistema imunológico e reduzir os efeitos adversos do estresse por calor (Yao et al., 2023). A inclusão de extratos vegetais, como boldo, oliveira e hortelã-pimenta, nas dietas das aves tem demonstrado benefícios benéficos, incluindo melhor desempenho

produtivo, equilíbrio da microbiota intestinal e proteção contra danos inflamatórios (Ma et al., 2024).

A busca por novas fontes naturais de extratos para compor suplementação nutricional animal tem incentivado o estudo de espécies nativas com potencial biotecnológico. Conhecida popularmente como castanheira-do-Gurguéia, fava-do-morcego ou garampara, a *Dipteryx lacunifera* Ducke é uma espécie frutífera da família *Leguminosae* (Ribeiro et al., 2012) Uma planta do Cerrado nordestino, desponta como uma opção promissora. A casca do fruto, frequentemente descartada, pode possuir grande potencial enzimático para aplicações como aditivo alimentar em dietas de frangos de corte.

O trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da inclusão de proteases brutas e purificadas da casca da castanheira-do-gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke) na dieta de pintos de corte durante a fase pré-inicial (1 a 7 dias de idade), sob condições de estresse térmico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento

O experimento foi realizado em galpão convencional (Figura 1) para frangos de corte do Colégio Técnico pertencente a Universidade Federal do Piauí (UFPI) no Campus Professora Cinobelina Elvas (CPCE), localizado no município de Bom Jesus-PI.

Figura 1 – Galpão convencional localizado no Colégio Técnico de Bom Jesus, UFPI.



Fonte: Arquivo pessoal

2.2 Animais e formulação das rações

Foram utilizados 150 pintos de corte da linhagem Cobb, com idades entre 1 e 7 dias, distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado. As aves foram

alocadas em 3 tratamentos com dois níveis de adição de extrato bruto e purificado da castanheira-do-gurguéia: 0 e 300 unidades/g de ração, correspondendo a 2,1 g/kg de ração do extrato bruto e para o purificado 6,6 g/kg de ração), com 5 repetições de 10 aves cada. A distribuição das aves foi realizada de forma que todas as unidades experimentais contivessem animais com pesos semelhantes. Os pintos foram alojados em gaiolas de 1,5 m² localizadas dentro de um galpão de alvenaria (Figura 2). Cada gaiola estava equipada com um sistema de aquecimento por campânulas elétricas, comedouros e bebedouros.

Figura 2 – Pintos de corte alojados nas gaiolas.



Fonte: Arquivo pessoal

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI/CPCE), protocolo CEUA-BJ 010/2023. Nº da Solicitação ou Autorização SISBIO 86385.

As aves receberam água à vontade e ração formulada para atender às suas exigências nutricionais, conforme descrito por Rostagno *et al.* (2024) (Tabela 1). O programa de iluminação natural-artificial consistirá em duas horas de escuridão durante a primeira semana de vida das aves.

Tabela 1. Composição percentual e valores nutricionais calculados das rações utilizadas nos experimentos.

Alimento	Pré-inicial
Milho grão	60,12

Soja farelo 45%	33,51
Fosfato bicálcico	2,228
Calcário	1,097
Inerte	0,660
Óleo de soja	0,447
Sal comum	0,441
L-lisina HCL	0,386
DL-metionina	0,363
L-treonina	0,184
L-valina	0,138
L-arginina	0,105
Premix frangos vit inicial *	0,200
Premix mineral frangos**	0,100
Virginamicina	0,015
Total	100,0
Níveis nutricionais calculados	
Matéria seca	87,4262
Energ. Met.aves (mcal/kg)	2,9300
Proteína bruta (%)	21,1328
Arginina dig.aves (%)	1,3710
Lisina dig.aves (%)	1,2690
Metionina dig.aves (%)	0,6499
Met.+Cist.dig.aves (%)	0,9270
Treonina dig.aves (%)	0,8380
Triptofano dig.aves (%)	0,2290
Valina dig.aves (%)	0,9770
Fibra bruta (%)	3,1564
Fosforo disponível (%)	0,5240
Gordura (%)	2,9849
Calcio (%)	1,0990
Sódio (%)	0,2160

*BHT 4,000 mg/kg; Galato de propilo 2,200 mg/kg; Vitamina A 13.200.000 UI/kg; Vitamina D3 3.300.000 UI/kg; Vitamina E 25.000 mg/kg; Vitamina K3 3.000 mg/kg; Vitamina B1 2.100 mg/kg; Vitamina B2 7.300 mg/kg; Vitamina B6 3.200 mg/kg; Vitamina B12 19.000

mcg/kg; Biotina 75.000 mcg/kg; Niacina 45.000 mg/kg; Ácido Pantotênico 13.000 mg/kg e Ácido Fólico 1.100 mg/kg.

** BHT 4,000 mg/kg; Galato de propilo 2,200; Cobre 10.000 mg/kg; Zinco 75.000 mg/kg; Manganês 85.000 mg/kg; Ferro 65.000 mg/kg; Iodo 1.100 mg/kg e Selênio, 330 mg/kg.

2.3 Monitoramento das condições experimentais e delineamento experimental

Para monitoramento da temperatura e da umidade do ar foram feitas com um auxílio de um medidor datalogger programado para coletar dados a cada hora, dentro do galpão mantido próximo às gaiolas. Após a coleta desses dados, foram convertidos no Índice de temperatura e umidade (ITU), proposto por Thom (1959).

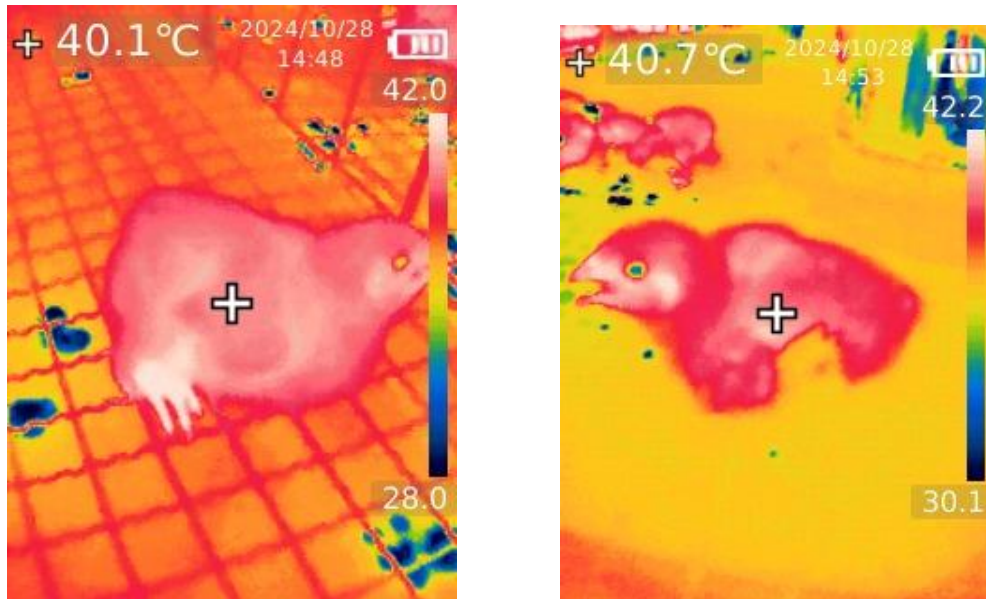
Entre 1 e 7 dias de idade, as aves foram pesadas bem como as rações utilizadas e as sobras, os dados foram utilizados para o cálculo do ganho de peso (GP), do consumo de ração (CR) e da conversão alimentar (CA). A mortalidade das aves foi registrada diariamente, pesando as aves mortas para a correção do consumo de ração e da conversão alimentar, conforme descrito por Sakomura e Rostagno (2016). Além disso, foi calculada a viabilidade, e aos 7 dias, avaliou-se a porcentagem de aves com dificuldade de locomoção.

Com sete dias de idade, no período da tarde (entre 14h e 16h), antes das pesagens das aves, foram aferidos os parâmetros fisiológicos dos pintinhos, incluindo a temperatura de cloaca (TC), a frequência respiratória (FR) e as temperaturas superficiais (TS) de 2 aves de cada gaiola, escolhidas aleatoriamente, totalizando 10 aves por tratamento.

Primeiramente, foram coletados os dados de FR e TC. A FR foi obtida por meio da contagem dos movimentos do tórax do animal, a avaliação foi realizada durante quinze segundos e, em seguida, o valor contabilizado foi multiplicado por quatro, obtendo-se o número de movimentos por minuto (mov/min). Para a obtenção da TC, utilizou-se um termômetro clínico digital, que foi introduzido na cloaca da ave de modo a permanecer em contato com a mucosa até a emissão de um sinal sonoro.

As imagens termográficas foram capturadas na região central do corpo das aves. A mesma distância focal foi mantida em cada coleta de dados, com a câmera posicionada a uma distância de 30 a 50 cm dos animais (figura 1). O dispositivo de termografia (UNI-T, UTI260B) foi ajustado para uma emissividade de 0,95. Todas as imagens foram transferidas para um computador e processadas utilizando o software *UTi-Live Screen V1.58*.

Figura 3. Imagens termográficas da avaliação da temperatura da superfície de pintinhos de 7 dias de idade estressados por calor.



Fonte: arquivo pessoal.

No momento da avaliação dos parâmetros fisiológicos de cada ave, utilizando o medidor de estresse térmico (ASKO-AK887), foram registradas a temperatura ambiente (TA), a temperatura de ponto de orvalho, a temperatura de globo negro (TGN) e a umidade relativa do ar (UR). Com base nessas informações, foram calculados o ITU e o Índice de Temperatura de Globo e Umidade (ITGU). O cálculo do ITU foi realizado de acordo com Thom (1959), utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{ITU} = T_{bs} + 0,36T_{po} + 41,2, \text{ onde:}$$

- T_{bs} é a temperatura de bulbo seco (°C)
- T_{po} é a temperatura do ponto de orvalho (°C).

Além disso, o ITGU, proposto por Buffington et al. (1981), foi calculado pela fórmula:

$$\text{ITGU} = T_{gn} + 0,36T_{po} + 41,5, \text{ onde:}$$

- T_{gn} é a temperatura de globo negro (°C)
- T_{po} é a temperatura do ponto de orvalho (°C).

2.4 Análise estatística

As comparações entre as médias foram realizadas utilizando o teste de Tukey, com nível de significância de 5%. A análise estatística foi realizada com o software Sisvar versão 5.3 (FERREIRA, 2014).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variação climática no ambiente experimental evidenciou amplitudes térmicas relevantes, com temperaturas oscilando entre 24,5°C e 39,42°C (média de 32,62°C) e umidade relativa entre 23,9% e 65,7% (média de 40,4%) (tabela 2 e figura 2). Esses valores confirmam que as aves enfrentaram condições de estresse térmico (Macari et al., 2004).

Tabela 2. Dados climáticos durante a condução experimental.

	Mínima	Máxima	Media
Temperatura (°C)	24,5	39,4	32,6
UR* (%)	23,9	65,7	40,4
ITU*	71,03	87,26	80,21

*Umidade relativa

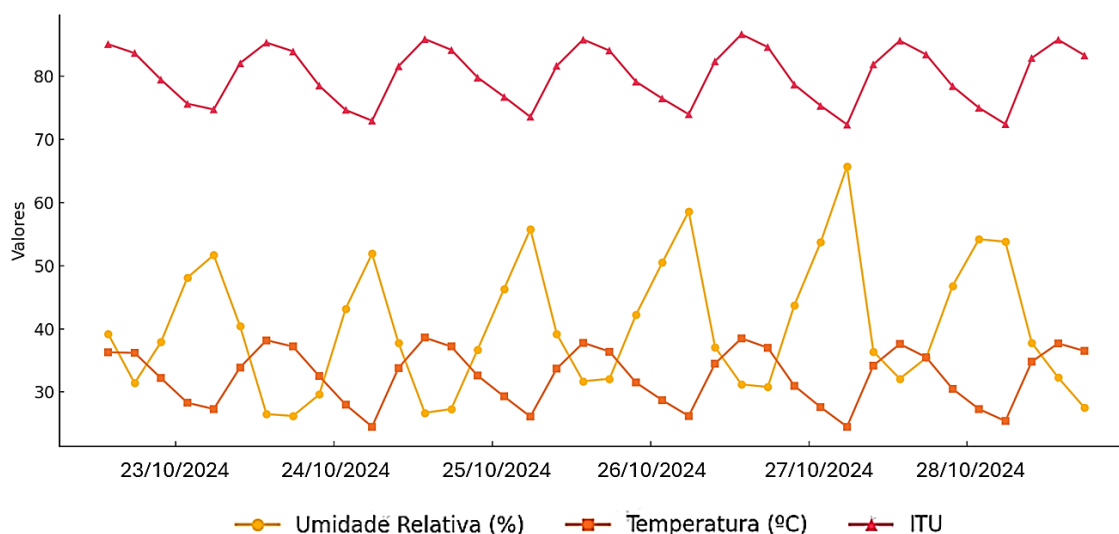
*índice de temperatura e umidade

Os problemas adquiridos as altas temperaturas nas primeiras semanas de criação dos pintinhos pode resultar em perdas significativas ao longo do processo produtivo. Na a primeira semana, é essencial manter temperaturas entre 32°C e 35°C, pois nestas condições minimizam o desvio de energia consumida para a manutenção do sistema termorregulador, favorecendo o desempenho zootécnico e a lucratividade da produção (Souza et al., 2011; Vieira et al., 2016).

Altas temperaturas podem levar à redução do consumo alimentar, utilização das reservas corporais para termogênese, imunossupressão e, em casos extremos, aumento da mortalidade (Sejian et al., 2012). Ao avaliar o Índice de Temperatura e Umidade pôde-se observar que variou de 71,03 a 87,26, com média de 80,21 como visto anteriormente (tabela 2).

Durante a primeira semana de vida das aves, recomenda-se que o ITU permaneça entre 72,4 e 80,0 para assegurar um ambiente térmico confortável, essencial ao crescimento e bem-estar dos animais (Abreu e Abreu, 2011; Silva, 2007). Conforme ilustrado na Figura 02, o ITU excedeu o limite superior de 80,0 por 11 a 13 horas consecutivas diariamente, sugerindo que as aves foram submetidas a estresse térmico prolongado.

Figura 4. Variação da temperatura, umidade e índice de temperatura e umidade (ITU) ao longo do período experimental.



Para a análise dos parâmetros fisiológicos realizada no dia 7 no turno da tarde foram coletados dados referentes a TA e UR onde pôde-se observar a similaridade nos dois grupos, com valores médios de 39,09 °C e 27,80% respectivamente. Consequentemente, também não houve diferença ($P>0,05$) no ITU e no ITGU, com valores médios de 86,67 e 86,87, respectivamente (tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros fisiológicos de frangos de corte de 1 a 7 dias sob estresse térmico por calor.

Tratamento	TA	UR	ITU	ITGU	FR	TC	TS
Controle	38,96 a	28,60 a	84,47 a	86,71 a	130,80 a	41,58 a	41,50 a
EBCG	39,26 a	26,36 a	86,80 a	86,90 a	137,20 a	42,08 a	41,35 a
EPCG	39,06 a	28,46 a	86,75 a	86,99 a	135,20a	42,30 a	42,06 a
Média geral	39,09	27,80	86,67	86,87	134,40	41,98	41,63
CV(%)	1,63	13,93	0,64	1,00	9,30	1,26	2,29

TA = temperatura do ar (°C); UR = umidade relativa (%); ITU = índice de temperatura e umidade; ITGU = índice de temperatura do globo negro e umidade; FR = frequência respiratória (mov/min); TC = temperatura de cloaca (°C); TS = temperatura superficial; CV = coeficiente de variação, EBCG = extrato bruto da castanha-do-gurguéia.

Os resultados indicam que o ambiente experimental foi caracterizado por condições de estresse térmico, conforme evidenciado pelos valores de ITU e ITGU, que ficaram acima da faixa recomendada para o conforto térmico, durante a primeira semana de vida dos pintinhos

de corte. Segundo Abreu & Abreu (2001), os valores de ITU para frangos de corte devem variar entre 72,4 e 80,0 na primeira semana de idade. No presente estudo, os valores médios de ITU foram de 86,67, indicando condições ambientais de estresse térmico.

Oliveira et al. (2006) ao avaliar valores de ITGU em conforto térmico para aves durante a primeira semana variando entre 77,0 e 80,0, entretanto para a segunda e terceira semanas, há uma diminuição dessa faixa para 73 a 76. Já para os estudos realizados por Cella et al. (2001) mostra que a faixa de ITGU é de 77 a 81, adequada para frangos de corte na primeira semana de vida. Para Cândido et al. (2016) esses achados ao identifica que a faixa ótima de ITGU para frangos de corte na primeira semana de vida varia entre $75,8 \pm 1,0$ e $79,7 \pm 1,6$.

Ao avaliar dados de ITGU observados neste estudo mostra um aumento considerável ao comparar com intervalos considerados ideais, caracterizando um ambiente de estresse térmico para os animais.

Ao avaliar os parâmetros fisiológicos das aves, FR, a TC e a TS, foi observado que não apresentaram diferenças ($P>0,05$) entre os tratamentos avaliados. A FR teve uma média de 134,40mov/min. A TC apresentou uma média de 41,98 °C, enquanto a TS registrou um valor médio de 41,63 °C.

Comparando os dados de Ferraz et al. (2023), ao trabalhar com pintinhos de corte macho da linhagem Cobb na primeira semana de vida em condições de conforto térmico (ITU entre 78,80 e 80,58), encontraram os seguintes valores médios de FR de 56,1 mov/min e TC de 40,0 °C. Em contrapartida, no presente estudo, as aves apresentaram uma FR significativamente mais elevada (134,40 mov/min) e uma TC média de 41,98 °C, indicando o estresse térmico sofrido pelas aves.

Como relatado em seu estudo Cordeiro et al. (2014), pintinhos em condições de conforto térmico exibem uma frequência respiratória próxima a 47 mov/min. Oliveira et al. (2006) ao avaliar a TC considera uma temperatura ideal de 42 °C representando condições de normalidade para pintos de corte nas primeiras três semanas de vida. Apesar da TC média de 41,98 °C estar próxima desse valor, os dados de FR indicam que as aves podem ter adotado mecanismos compensatórios para lidar com o calor excessivo, para dissipar calor via evaporação.

Na avaliação da temperatura superficial registrou um valor médio de 41,63 °C. Este resultado está em concordância com os dados encontrados por Malheiros et al. (2000), que avaliaram pintinhos machos da linhagem Cobb aos 7 dias de idade onde a temperatura superficial média de 32,7°C em ambiente de 20°C, 35,1°C sob 25°C e 36,4°C quando a

temperatura ambiente foi de 35°C. Segundo Malheiros et al. (2000), as variações na temperatura superficial estão intimamente associadas às respostas do sistema cardiovascular, sendo o aumento ou diminuição do fluxo sanguíneo periférico um fator determinante na regulação da temperatura da pele, especialmente durante a exposição a diferentes condições térmicas.

Nascimento et al. (2014) em seu trabalho observaram que pintinhos criados em condições de conforto térmico apresentaram uma temperatura superficial média de 35,2°C. Em contrapartida, no presente trabalho obtiveram uma média de 41,63°C, indicando uma adaptação dos animais a condições térmicas mais extremas, evidenciando um possível estresse térmico em resposta ao ambiente mais quente.

Os resultados apresentados na Tabela 4 estão descritos a inclusão do extrato bruto e Purificado castanheira-do-gurguéia na ração dos frangos de corte onde observou uma influência positiva para o desempenho das aves.

Tabela 4 - Desempenho de frangos de corte de 1 a 7 dias suplementados com Extrato Bruto e Purificado da Castanheira do Gurgueia.

Tratamento	Peso 1 dia (g)	Peso 7 dias (g)	GP (g)	CR (g)	CA (g/g)	Viab (%)	Loc (%)
Controle	41,18 a	82,08c	40,90c	76,03c	1,86a	98,00a	54,00a
EBCG	41,40 a	103,06b	61,66b	87,76b	1,43b	96,00a	32,00a
EPCG	41,36 a	137,10 a	95,74 a	107,24a	1,12c	84,00a	2,00b
Média geral	41,31	107,41	66,10	90,34	1,47	92,66	29,33
CV(%)	2,38	5,07	9,29	7,11	7,15	12,15	58,05

GP = ganho de peso; CR = consumo de ração; CA = conversão alimentar; Viab = viabilidade; Loc = dificuldade de locomoção; CV = coeficiente de variação, EBCG = extrato bruto contendo protease da casa da castanheira-do-Gurguéia, EPCG = extrato purificado contendo protease purificadas da casca castanheira-do-Gurguéia.

Não houve diferença ($P>0,05$) com relação ao peso inicial (dia 1), garantindo homogeneidade entre os tratamentos no início do experimento. No entanto, no dia 7, as aves que receberam EBCG e EPCG apresentaram peso final significativamente maior para o tratamento EPCG refletindo em um GP superior comparado ao EBCG e ao grupo controle. Além disso, o CR foi maior no grupo EPCG comparado ao EBCG e ao controle, associado a uma melhora na eficiência alimentar, evidenciada pela menor CA (1,12g) para o grupo suplementado com EPCG. Não houve diferenças ($P>0,05$) para a viabilidade. Em relação à

dificuldade de locomoção, observou-se uma alta porcentagem de aves com problemas locomotores em ambos os tratamentos.

Em relação aos parâmetros de desempenho esperados para a linhagem C500, de acordo com o manual da Cobb (2022), o ganho de peso esperado para os machos dessa linhagem aos 7 dias é de 205 g, com uma conversão alimentar de 0,883 e um consumo de ração de 182 g.

Os resultados apresentados por Omran et al. (2020) indicam que o estresse térmico durante os primeiros dias de vida prejudica significativamente o desempenho inicial de pintinhos de corte, como evidenciado pela redução no peso vivo (147,91 g no grupo estressado versus 158 g no controle) e no ganho de peso (106,05 g no grupo estressado versus 117,07 g no controle). No entanto, vale destacar que, nesse estudo, as aves foram expostas a 40°C por apenas 3 horas diárias, enquanto em nosso experimento as condições ambientais representaram uma situação de estresse térmico mais severo e prolongado.

Quando comparados aos dados obtidos em nosso experimento, verifica-se que, mesmo sob essas condições desafiadoras, a inclusão do EBCG e EPCG contribuíram para um desempenho superior das aves tratadas em relação ao grupo controle. Aos 7 dias, as aves do grupo EPCG apresentaram peso final de 137,10 g, significativamente maior comparado ao EBCG (103,06g) e ao o grupo controle (82,08 g), além de uma menor conversão alimentar (1,43 g/g no grupo EBCG versus 1,86 g/g no controle), indicando maior eficiência na ação do extrato na dieta. Angel et al. (2011), ao testar a inclusão de protease em dietas para frangos de corte, independente da concentração utilizada, observou-se aumento no ganho de peso e melhoria na conversão alimentar. Cowieson et al. (2016) não encontraram diferenças significativas para ganho de peso e consumo de ração para frangos de corte alimentados com dietas a base de milho, farelo de soja e farelo de canola suplementadas com protease até sete dias de idade.

Embora o desempenho tenha sido influenciado positivamente pela utilização dos extratos brutos e purificado, uma alta porcentagem de aves apresentou dificuldade de locomoção em ambos os tratamentos. No entanto, o grupo alimentado com EPCG teve uma incidência menor de problemas locomotores (2%) em comparação ao EBCG (32%) e ao controle (54%) (tabela 4).

Diversos fatores, como linhagem, idade, sexo, nutrição, alojamento e manejo, influenciam os distúrbios locomotores em frangos de corte (Toghyani et al., 2011; Schwean-Lardner et al., 2013). Dentre eles, o estresse térmico é um dos principais fatores que reduz o ganho de peso corporal ao comprometer a ingestão e a absorção de nutrientes, prejudicando a função intestinal (Belay e Teeter, 1993). Além disso, o estresse térmico induz perda óssea devido à menor absorção de cálcio e ao aumento da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-

adrenal, elevando os níveis de corticosterona (Hosseini-Vashan et al., 2016; Xu et al., 2018). O excesso de corticosterona tem impactos negativos na saúde óssea, inibindo a formação de osteoblastos, promovendo a apoptose de osteoblastos e osteócitos (células responsáveis pela formação e manutenção óssea) e aumentando a sobrevivência de osteoclastos (células que reabsorvem o tecido ósseo) (Jia et al., 2006; Rauch et al., 2010; Henneicke et al., 2014). Paralelamente, a elevação da temperatura corporal intensifica a produção de espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias, resultando em estresse oxidativo (Huang et al., 2015), o que agrava os danos ao sistema esquelético.

4. CONCLUSÃO

A inclusão dos extratos contendo as proteases brutas e purificadas extraídas da casca da castanheira-do-Gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke) mostrou-se uma alternativa promissora para a suplementação na dieta de frangos de corte. Tendo em vista que o extrato purificado se mostrou mais eficaz no desempenho zootécnico (consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar) tendo em vista o estresse térmico. São necessários mais estudos para aprofundar mais o conhecimento sobre os mecanismos de ação do extrato e avaliar sua aplicação em diferentes parâmetros de análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, V. M. N.; ABREU, P. G. Os desafios da ambiência sobre os sistemas de aves no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Concórdia, v. 40, n. 1, p. 1-14, 2011.
- CAHANER, A.; DRUYAN, S.; DEEB, N. Improving broiler meat production, especially in hot climates, by genes that reduce or eliminate feather coverage. **British Poultry Science**, v. 44, 2003.
- CÂNDIDO, MÁRCIA GL et al. Determination of thermal comfort zone for early-stage broilers. **Engenharia Agrícola**, v. 36, n. 5, p. 760-767, 2016.
- CELLA, P. S.; DONZELE, J. L.; OLIVEIRA, R. F. M.; ALBINO, L. F. T.; FERREIRA, A. S.; GOMES, P. C.; VALERIO, S. R.; APOLONIO, L. R. Níveis de lisina mantendo a relação aminoacídica para frangos de corte no período de 1 a 21 dias de idade, em diferentes ambientes térmicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 2, mar./apr. 2001.
- COBB-VANTRESS. Cobb 500: **Broiler Performance & Nutrition Supplement**. 2022. Disponível em: <https://www.cobbgenetics.com/assets/Cobb-Files/2022-Cobb500-Broiler-Performance-Nutrition-Supplement.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2025.
- CORDEIRO, MARCELO et al. Avaliação do estresse térmico em frangos caipiras criados em condições climáticas do estado do Acre. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 19, 2014.
- FERRAZ, P. F. P. et al. **Physiological and behavioural parameters of broiler chicks grown under different heating systems**. 2023.
- FERREIRA, R. A. Maior produção com melhor ambiente para aves, suínos e bovinos. **Aprenda Fácil**, Viçosa, p. 296, 2016.
- HENNEICKE, H., S. J. GASPARINI, T. C. BRENNAN-SPERANZA, H. ZHOU, AND M.J. SEIBEL. Glucocorticoids and bone: local effects and systemic implications. **Trends Endocrinol. Metab.** 25:197–211. 2014.
- HOSSEINI-VASHAN, S. J., A. GOLIAN, and A. Yaghobfar. Growth, immune, antioxidant, and bone responses of heat stress-exposed broilers fed diets supplemented with tomato pomace. **Int. J. Biometeorol.** 60:1183–1192. 2016.
- HUANG, C.; JIAO, H.; SONG, Z.; ZHAO, J.; WANG, X.; LIN, H. Heat stress impairs mitochondria functions and induces oxidative injury in broiler chickens. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 5, p. 2144-2153, 2015.
- LIU, LILI et al. Heat stress impacts on broiler performance: a systematic review and meta-analysis. **Poultry Science**, v. 99, n. 11, p. 6205-6211, 2020.
- MA, DANDAN; ZHANG, MINHONG; FENG, JINGHAI. Dietary Peppermint Extract Inhibits Chronic Heat Stress-Induced Activation of Innate Immunity and Inflammatory Response in the Spleen of Broiler Chickens. **Animals**, v. 14, n. 8, p. 1157, 2024.
- MACARI, M.; FURLAN, R.L.; MAIORKA, A. Aspectos fisiológicos e de manejo para manutenção da homeostase térmica e controle de síndromes metabólicas. In: MENDES, A.A.;

NÄÄS, I.A.; MACARI, M. (Eds.) Produção de frangos de corte. Campinas: **FACTA**. p.137-155. 2004.

MALHEIROS, R. D. et al. Environmental temperature and cloacal and surface temperatures of broiler chicks in first week post-hatch. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 9, n. 1, p. 111-117, 2000.

NASCIMENTO, GUILHERME R. do et al. Termografia infravermelho na estimativa de conforto térmico de frangos de corte. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, p. 658-663, 2014.

OLIVEIRA, R. F. M.; DONZELE, J. L.; ABREU, M. L. T.; FERREIRA, R. A.; VAZ, R. G. M. V.; CELLA, P. S. Efeitos da temperatura e da umidade relativa sobre o desempenho e o rendimento de cortes nobres de frangos de corte de 1 a 49 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 3, p. 797-803, 2006.

OMRAN, O. M.; GALAL, A.; MAHROUS, M. Y.; BADRI, F. B. Impact of heat stress on growth performance and carcass traits in some broiler chickens. **Arab University Journal of Agricultural Sciences**, Ain Shams University, Cairo, Egypt, v. 82, n. 2, p. 651-662, 2020.

RIBEIRO, F. S. C.; SOUZA, V. A. B.; LOPES, A. C. A. Physical characteristics and chemical-nutritional composition of the castanheira-do-gurguéia fruit (*Dipteryx lacunifera* Ducke). **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, p. 301-311, 2012.

ROSTAGNO, HORACIO SANTIAGO; ALBINO, LUIZ FERNANDO TEIXEIRA (eds.). **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 5. ed. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema. 531 p. DOI: <http://dx.doi.org/10.26626/978-85-8179-206-4.2024.B001>. ISBN 978-85-8179- 206-4. 2024.

SAKOMURA, N.K., ROSTAGNO, H.S. **Metodologias de pesquisa em nutrição de monogástrico**. Funep, Jaboticabal, SP, Brazil. 2016.

SCHWEAN-LARDNER, K., B. I. FANCHER, S. GOMIS, A. VAN KESSEL, S. DALAL, AND H. L. CLASSEN. Effect of day length on cause of mortality, leg health, and ocular health in broilers. **Poult. Sci.** 92:1–11. 2013.

SEJIAN, VEERASAMY et al. (Ed.). **Environmental stress and amelioration in livestock production**. Springer Berlin Heidelberg, 2012.

SILVA, E. T. Índice de temperatura e umidade (itu) na produção de aves para a mesoregião do Nordeste e Norte pioneiro Paranaense. **Revista Acadêmica**, Curitiba, v. 5. n. 4. p. 385-390, 2007.

SOUZA, M. G.; OLIVEIRA, R. F. M.; DONZELE, J. L.; MAIA, A. P. A.; BALBINO, E. M.; OLIVEIRA, W. P. Utilização das vitaminas C e E em rações para frangos de corte mantidos em ambiente de alta temperatura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 40: 2192-2198, 2011.

THOM, E.C. **The discomfort index**. *Weatherwise*, Boston, v.12, n.1, p.57- 60. 1956.

TOGHYANI, M., M. TOGHYANI, H. A. SHAHRYAR, AND M. ZAMANIZAD. Assessment of growth performance, immune responses, serum metabolites, and prevalence of leg weakness

in broiler chicks submitted to early-age water restriction. *Trop. Anim. Health Prod.* 43:1183–1189. 2011.

VIEIRA, A.M.C., VIEIRA, F.M.C., SILVA, J.O., BARBOSA FILHO, J.A.D. The influence of thermal conditions from an environmentally controlled preslaughter lairage on mortality of broiler chickens. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootecia*, v.68. doi: 10.1590/1678-4162-7872. 2016.

XU, Y., X. LAI, Z. LI, X. ZHANG, and Q. LUO. Effect of chronic heat stress on some physiological and immunological parameters in different breed of broilers. *Poult. Sci.* 97:4073–4082. 2018.

YAO, YUEZHOU et al. Effects of rosemary extract supplementation in feed on growth performance, meat quality, serum biochemistry, antioxidant capacity, and immune function of meat ducks. *Poultry Science*, v. 102, n. 2, p. 102357, 2023.

ANGEL, C.R.; SAYLOR, W.; VIEIRA, S.L., WARD, N. Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7- to 22-day-old broiler chickens. *Poultry Science*, v.90, p. 2281–2286, 2011.

COWIESON AJ, LU H, AJUWON K, KNAP I, ADEOLA O. Interactive effects of dietary protein source and exogenous protease on growth performance, immune competence and jejunal health of broiler chickens. *Anim. Prod. Sci.* 2016.

ANEXOS

TRABALHOS PRODUZIDOS	2023 a 2024
INCIDÊNCIA DE FUNGOS EM SEMENTES DE UROCHLOA BRIZANTHA	CAPITULO DE LIVRO
INTENSIDADE INFLAMATÓRIA DO PÂNCREAS EM FRANGOS DE CORTE EM FUNÇÃO DE NÍVEIS ELETROLÍTICOS DA DIETA SOB ESTRESSE POR CALOR	CAPITULO DE LIVRO
UTILIZAÇÃO DO TESTE DE ARTEMIA SALINA PARA ENSAIOS DE DOSAGEM DE TOXICIDADE	CAPITULO DE LIVRO
RESUMO EXPANDIDO -AVALIAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DAS PROTEASES PRODUZIDAS POR TRICHODERMA ORIENTALE FERMENTADO EM CASCAS DE LARANJAS E EXTRAÍDAS POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS	V SEMANA CIENTÍFICA DO AGRESTE PERNAMBUCANO
RESUMO EXPANDIDO - AVALIAÇÃO DE PROTEASES COAGULANTE DO LEITE UTILIZANDO RESÍDUOS E CO-PRODUTOS AGROINDUSTRIAIS A PARTIR DE TRICHODERMAS SP. ISOLADOS DE UM ECÓTONO CAATINGA/CERRADO PIAUIENSE	V SEMANA CIENTÍFICA DO AGRESTE PERNAMBUCANO
RESUMO SIMPLES - PRÉ-PURIFICAÇÃO DE PROTEASES COM ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA ORIUNDOS DA CASCA DA FAVA DO MORCEGO (DIPTERYX LACUNIFERA DUCKE)	EPIBIO
RESUMO SIMPLES -EPIBIO-AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA E DE CO-FATORES SOBRE A ATIVIDADE PROTEÁSICA DE UMA ENZIMA PROTEOLITICA EXTRAIDA DA CASCA DA FAVA DO MORCEGO (DIPTERYX LACUNIFERA DUCKE)	EPIBIO
RESUMO SIMPLES -USO DE PROTEASES DA CASTANHEIRA DO GURGUÉIA (Dipteryx lacunifera Ducke) NA GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE TRIGO (Triticum aestivum L.)	EPIBIO
RESUMO SIMPLES -OBTENÇÃO DE PROTEASES A PARTIR DA CASTANHA DE DIPTERYX LACUNIFERA (FAVA DO MORCEGO) E SUA COMPATIBILIDADE COMO ADITIVO EM RAÇÕES DE AVES E CAPRINOS	CNPA
RESUMO SIMPLES - AVALIAÇÃO DE PROTEASES DA CASCA DA CASTANHEIRA DO GURGUÉIA (Dipteryx lacunifera Ducke) NA APLICAÇÃO EM RAÇÃO PARA FRANGOS DE CORTE	CNPA
RESUMO SIMPLES - PRODUÇÃO DE PROTEASES POR TRICHODERMA ORIENTALE ISOLADO DO ECÓTONO CERRADO PIAUIENSE FERMENTADO EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E COMPATIBILIDADE ENZIMÁTICA COM DETERGENTES E SABÕES COMERCIAIS	CNPA

RESUMO SIMPLES- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA E TOXICIDADE DA CASTANHEIRA DO GURGUÉIA (<i>DIPTERYX LACUNIFERA</i> DUCKE)	XII - SEMANA ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
MENÇÃO HONROSA- AVALIAÇÃO DE PROTEASES DA CASCA DA CASTANHEIRA DO GURGUÉIA (<i>Dipteryx lacunifera</i> Ducke) NA APLICAÇÃO EM RAÇÃO PARA FRANGOS DE CORTE	CNPA
PREMIAÇÃO- DIGESTIBILIDADE IN VITRO DE RAÇÕES AVÍCOLAS ENRIQUECIDAS COM PROTEASES EXTRAÍDAS DA FAVA DO MORCEGO (<i>DIPTERYX LACUNIFERA</i> DUCKE)	CIAGRO
APRESENTAÇÃO ORAL- EXTRACTION, BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION, AND TOXICITY EVALUATION OF PROTEASES FROM THE FRUIT PEEL OF THE GURGUÉIA NUT TREE (<i>DIPTERYX LACUNIFERA</i> DUCKE) AND ASSESSMENT OF THEIR STABILITY IN BROILER CHICKEN FEED	I JORNADA CIENTÍFICA DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA TROPICAL/PPGZT
RESUMO SIMPLES- PRE-PURIFICATION OF FIBRINOLYTIC PROTEASES FROM GURGUEIA CHESTNUT USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS	II SIMPÓSIO IBERO AMERICANO SOBRE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SISAB)
PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE DEFESA DE TCC	6 BANCAS
CO-ORIENTAÇÃO EM TCC	2 CO-ORIENTAÇÕES